



**ESTUDO DO EFEITO DA PRESSÃO NA
FISIOLOGIA DE LEVEDURAS**

Rita Isabel Couto Pinheiro

Dissertação para Doutoramento
em
Engenharia Química e Biológica

Departamento de Engenharia
Biológica

Escola de Engenharia
Universidade do Minho
2004



Tese realizada sob a orientação de

Doutor Manuel José Magalhães Mota

Professor Catedrático

e

Doutora Isabel Pires Belo

Professor Auxiliar

Universidade do Minho, Braga, 2004

aos meus pais

ao Frederico e ao João

Yeasts are the world's premier industrial microorganisms. In addition to their wide exploitation in the production of foods, beverages and pharmaceuticals, yeasts also play significant roles as model eukariotic cells in furthering our knowledge in the biological and biomedical sciences.

WALKER, 1998

Prefácio

As leveduras são, de facto, microrganismos fascinantes. A sua diversidade e dinâmica vão ao encontro de diversas áreas da ciência e da tecnologia. Algumas espécies desempenham funções importantes na produção de produtos alimentares e farmacêuticos, outras têm um papel relevante na depuração ambiental. Mas podem surgir também, como microrganismos indesejáveis, quando são agentes de doenças ou de degradação de alimentos. Além disso, as leveduras têm sido utilizadas como modelos de células eucariotas na procura de um maior conhecimento tecnológico e fundamental na área das ciências biológicas e biomédicas.

Embora a literatura sobre as leveduras seja extremamente vasta, torna-se cada vez mais necessário, do ponto de vista industrial, fazer a interligação entre o conhecimento do comportamento fisiológico (necessidades nutricionais, crescimento, metabolismo) e a tecnologia das leveduras.

A utilização do ar hiperbárico, em alternativa a outras técnicas de oxigenação de culturas, tem sido alvo de estudos da nossa equipa de investigação. De facto, os biorreactores pressurizados ocupam o meu pensamento há já mais de 7 anos, uma vez que a presente dissertação advém de um mestrado também decorrido nesta área. E quando o Professor Doutor Manuel Mota me propôs continuar na mesma linha de trabalho concordei de imediato, pois um ano de trabalho numa área tão fascinante parecia tão pouco, e havia ainda tanto para descobrir!

Assim, quero expressar o meu especial agradecimento ao Professor Doutor Manuel Magalhães Mota pela oportunidade que me proporcionou na realização

deste trabalho, pela sua orientação e por todas as facilidades proporcionadas, sem as quais teria sido impossível a sua concretização.

Para a concretização deste trabalho contribuíram também várias pessoas, a quem quero manifestar os meus agradecimentos.

Ao director do Departamento de Engenharia Biológica e director do Laboratório de Fermentações, Professor Doutor José Teixeira agradeço não só as facilidades concedidas durante a realização deste trabalho, mas também o seu sempre oportuno apoio e a sua contínua disponibilidade.

À Professora Doutora Isabel Pires Belo, co-orientadora deste trabalho, um muito obrigada pela sua orientação, pelos ensinamentos transmitidos, enfim, pela sua incansável ajuda, mas principalmente pela grande amizade, pela partilha de desabafos nos grandes momentos de tensão e naqueles momentos tão queridos como o nascimento dos nossos filhos. Obrigada Isabel!

Agradeço em especial ao Professor Doutor Eugénio Campos Ferreira, pela disponibilidade e paciência, sempre demonstradas.

Um especial agradecimento à Professora Doutora Maria Alice Coelho pela colaboração na análise de imagem realizada a algumas estirpes de leveduras.

Ao Professor Doutor Juan Castrillo, agradeço a amável cedência das estirpes utilizadas no trabalho.

Agradeço também a colaboração do Luís Amaral, pela partilha de conhecimentos em análise de imagem.

Agradeço ainda:

À minha tão querida amiga Ana Nicolau, que sempre me apoiou e partilhou todos os bons e maus momentos vividos, e me deu o exemplo de como tudo pode correr bem desde que haja sempre boa vontade. Obrigada Ana!

Às minhas amigas Alberta, Pilar e Cristininha pela amizade demonstrada a todo o momento, e pelas sessões de *cochichos* partilhadas no gabinete.

Às minhas amigas e colegas de laboratório, Isabel Rocha e Martinha, pelos bons momentos vividos, principalmente pela cantoria e alegria sempre presentes no laboratório de fermentações.

Não posso deixar de expressar o meu agradecimento pela colaboração da Karine e da Lara na execução laboratorial deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Engenharia Biológica, em especial à D. Fátima, à D. Maria dos Anjos, à Isabel Soares, e ao Sr. Santos, sempre presente nas alturas *SOS*, agradeço toda a ajuda e, principalmente, a simpatia e amabilidade sempre presentes.

Aos meus queridos Pais, que foram tão importantes ao longo destes anos de dedicação a este trabalho. Com o seu espírito sempre positivo, transmitiram-me incentivo e encorajamento. A sua constante presença foi fundamental nos momentos em que o pessimismo nos tenta vencer.

Ao meu marido João que sempre me encorajou com o seu bom humor. A sua presença e carinho foram cruciais para o meu bem-estar.

À minha fonte inspiradora que é o meu querido filhinho Frederico, que foi fundamental na conclusão desta tese.

À junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, pelo seu apoio financeiro de uma bolsa de Doutoramento que me foi concedida no âmbito do Programa Praxis XXI (BD/11498/97).

Sumário

A utilização industrial de leveduras requer que as células tenham um metabolismo eficiente, com produtividades elevadas, de modo a que a produção de biomassa ou qualquer outro produto seja o mais económica possível. Durante o decorrer de um processo biotecnológico ocorrem variações das condições operacionais, nomeadamente gradientes de pressão de gases, que provocam alterações ao metabolismo celular. Aliado a este factor, está a existência de limitação de oxigénio que ocorre com elevada frequência nos biorreactores industriais. Com este trabalho, pretende-se promover a utilização da pressão moderada para aumentar a taxa de transferência de oxigénio em culturas aeróbias de leveduras em alternativa ao aumento da potência de agitação e do caudal de arejamento. Para tal, foi estudado o efeito da pressão de ar e de oxigénio no comportamento metabólico e fisiológico de leveduras, em particular das leveduras *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022, *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 e *Candida utilis* CBS 621.

Foi demonstrado que o aumento da pressão de ar até 6 bar, em cultura descontínua, não inibiu o crescimento das duas estirpes de levedura *K. marxianus*, influenciando positivamente a formação de biomassa. A diferença encontrada no metabolismo oxidativo do etanol permitiu concluir que o aumento da pressão favorece a assimilação do etanol produzido pelas células da levedura *Kluyver* negativa (*K. marxianus* ATCC 10022). Relativamente à estirpe *Kluyver* positiva para a lactose (*K. marxianus* CBS 7894), verificou-se que o aumento da pressão total de ar até 6 bar, e consequentemente da taxa de transferência de oxigénio, aumenta consideravelmente a produtividade em biomassa. Com os resultados obtidos, conclui-se ainda que é possível, através da utilização do aumento da pressão de total de ar, conseguir a optimização da produção da enzima β -galactosidase.

A tolerância demonstrada pela levedura *K. marxianus* CBS 7894 à exposição a agentes indutores de espécies reactivas de oxigénio ficou demonstrada pela indução de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a glutathione reductase. Embora exista um limite da capacidade de indução, estas enzimas respondem melhor ao aumento da pressão de oxigénio e de ar do que à adição ao meio de cultura de paraquato ou de peróxido de hidrogénio, nas concentrações de 1 mM e de 50 mM, respectivamente. A enzima catalase revelou-se de menor importância na defesa do stresse oxidativo imposto às células. O pré-tratamento com uma pressão de ar sub-letal, 1.2 bar de ar, induziu maior tolerância nas células ao aumento subsequente da pressão de ar e de oxigénio puro.

Demonstrou-se que a pressurização do biorreactor, até 6 bar de ar, de culturas de *Candida utilis* a operar em semi-contínuo, com concentração celular de 40 g L⁻¹, não disponibiliza às células oxigénio suficiente para a sua actividade respiratória. Em contrapartida, com a utilização do ar hiperbárico até 12 bar é possível ultrapassar esta limitação, atingindo-se elevadas produtividades em biomassa sem formação de etanol.

Este trabalho permitiu demonstrar que, do ponto de vista fisiológico, a utilização do ar hiperbárico até aos valores testados constitui uma alternativa viável a outros métodos de oxigenação de culturas, especialmente em culturas de elevada densidade celular, sem causar danos nas células.

Abstract

In industrial biomass production, yeasts are required to have an efficient metabolism, with high productivities, in order to achieve an economical production process. During a biotechnological process differences in operational conditions take place, such as pressure gradients, leading to changes in cell metabolism. In a typical industrial cultivation, quite high cell densities are reached and oxygen is usually the major growth limiting factor. The use of pressure in bioreactors may be a way of improving oxygen transfer rate of aerobic cultures avoiding oxygen limitation.

The purpose of this research was to study the effects of air and oxygen pressure on the metabolic and physiological behavior of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022, *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 and *Candida utilis* CBS 621.

It was showed that an increase in total air pressure to 6 bar during a batch operation did not inhibit the growth of both yeast strains of *K. marxianus* and an enhancement of ethanol oxidation was also observed. However, some differences were found between these two strains. *K. marxianus* ATCC 10022 was a lactose-fermenting strain whereas *K. marxianus* CBS 7894 had a *Kluyver*-effect for lactose. On the other hand, increasing the air pressure and lactose concentration resulted in an inhibitory synergistic effect on fermentation with *K. marxianus* ATCC 10022.

Batch cultures of *K. marxianus* CBS 7894 exhibited an oxidative metabolism for lactose, thus ethanol was never produced. With the increase in air pressure it was possible to increase the biomass productivity of *K. marxianus* CBS 7894, without damaging the cells. The results indicated that it was possible to use an increased air pressure as an optimisation parameter for β -galactosidase production in high-density cell cultures with *Kluyveromyces marxianus* strains.

The response of *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 to 50 mM hydrogen peroxide, 1 mM paraquat and increasing air and pure oxygen pressures, were also studied. The effect of these oxidants on the metabolism and the induction of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase were investigated. A greater induction of these antioxidant enzymes by exposure to pressure than to chemicals was observed. Superoxide dismutase and glutathione reductase were preferentially induced rather than catalase. The yeast cells could not cope with pure oxygen pressures values up to 6 bar. However, when cells were previously exposed to sub-lethal air pressures, low enzymatic activity values were found after subsequent exposure to pure oxygen pressure.

The pressurisation of a bioreactor with 6 bar of air, did not supply the oxygen needed for a fed-batch culture of *Candida utilis* CBS 621 growing on sacarose with a cell density of 40 g·L⁻¹. However, this limitation was overcome by increasing air pressure to 12 bar, leading to higher biomass productivity without ethanol production.

This work has demonstrated that moderate air pressures, such as that was experimentally applied, can be a good alternative than other oxygenation methods, especially for high cell density cultures.

Índice

PREFÁCIO	I
SUMÁRIO.....	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE	VII
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XIX
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A BIOTECNOLOGIA	2
1.1.1 <i>A história da biotecnologia</i>	<i>3</i>
1.1.2 <i>Perspectivas futuras da biotecnologia.....</i>	<i>4</i>
1.2 OBJECTIVOS.....	6
1.3 ESTRUTURA DA TESE	8
CAPÍTULO 2. AS LEVEDURAS E A PRESSÃO: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 A IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DAS LEVEDURAS.....	14
2.1.1 <i>As leveduras na indústria.....</i>	<i>14</i>
2.1.2 <i>Engenharia genética.....</i>	<i>16</i>
2.1.3 <i>Tecnologia das fermentações.....</i>	<i>18</i>
2.2 OS PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO CELULAR	26
2.2.1 <i>Aspectos fisiológicos das leveduras</i>	<i>26</i>
2.2.2 <i>Necessidades nutricionais das leveduras</i>	<i>34</i>
2.2.3 <i>Parâmetros físico-químicos</i>	<i>36</i>
2.3 A PRESSÃO	38
2.3.1 <i>A pressão na indústria.....</i>	<i>38</i>
2.3.2 <i>Efeito da pressão total.....</i>	<i>39</i>
2.3.3 <i>Efeito da pressão parcial de dióxido de carbono</i>	<i>45</i>
2.3.4 <i>Efeito da pressão parcial de oxigénio</i>	<i>48</i>

CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS.....	61
3.1 BIORREACTORES HIPERBÁRICOS	64
3.1.1 <i>Biorreactor Whitey de 0.3 L.....</i>	<i>64</i>
3.1.2 <i>Biorreactor Whitey de 1 L.....</i>	<i>67</i>
3.1.3 <i>Biorreactor Parr.....</i>	<i>69</i>
3.2 ENSAIOS À PRESSÃO ATMOSFÉRICA	73
3.2.1 <i>Biorreactor Biolab.....</i>	<i>73</i>
3.2.2 <i>Ensaio com micro-arejamento.....</i>	<i>74</i>
3.3 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÉNIO	76
3.3.1 <i>Métodos em estado transiente.....</i>	<i>76</i>
3.3.2 <i>Métodos em estado estacionário.....</i>	<i>78</i>
3.4 DETERMINAÇÃO DOS RENDIMENTOS, PRODUTIVIDADE E TAXAS ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO.....	83
3.5 ANÁLISE DE IMAGEM E MÉTODOS MICROSCÓPICOS.....	85
3.5.1 <i>Análise de Imagem.....</i>	<i>85</i>
3.5.2 <i>Métodos Microscópicos</i>	<i>90</i>
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	93
3.6.1 <i>Concentração celular</i>	<i>93</i>
3.6.2 <i>Concentração de substrato</i>	<i>94</i>
3.6.3 <i>Metabolitos</i>	<i>95</i>
3.6.4 <i>Componentes intracelulares.....</i>	<i>96</i>
CAPÍTULO 4. EFEITO DA PRESSÃO NO METABOLISMO DE DUAS ESTIRPES DE <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i>.....	107
4.1 INTRODUÇÃO	110
4.1.1 <i>A taxonomia da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>.....</i>	<i>110</i>
4.1.2 <i>Propriedades morfológicas e fisiológicas.....</i>	<i>111</i>
4.1.3 <i>O efeito de <i>Kluyver</i>.....</i>	<i>112</i>
4.1.4 <i>O metabolismo da lactose</i>	<i>113</i>
4.1.5 <i>Aplicações industriais</i>	<i>116</i>
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	117
4.2.1 <i>Microorganismo e manutenção.....</i>	<i>117</i>
4.2.2 <i>Meios e condições de cultura.....</i>	<i>117</i>
4.2.3 <i>Condições de operação</i>	<i>118</i>
4.2.4 <i>Monitorização</i>	<i>121</i>
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
4.3.1 <i>A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 10022</i>	<i>122</i>
4.3.2 <i>A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894</i>	<i>129</i>

4.4	CONCLUSÕES	145
CAPÍTULO 5. EFEITO DA PRESSÃO NO METABOLISMO DA LEVEDURA <i>CANDIDA UTILIS</i>.....		
	UTILIS.....	147
5.1	INTRODUÇÃO.....	150
5.1.1	<i>A taxonomia da levedura Candida utilis</i>	150
5.1.2	<i>Propriedades morfológicas e fisiológicas</i>	151
5.1.3	<i>O metabolismo da sacarose</i>	152
5.1.4	<i>Aplicações industriais</i>	153
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	154
5.2.1	<i>Microorganismo e manutenção</i>	154
5.2.2	<i>Meios e condições de cultura</i>	154
5.2.3	<i>Condições de operação</i>	155
5.2.4	<i>Monitorização</i>	158
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	159
5.3.1	<i>Ensaaios em descontinuo</i>	159
5.3.2	<i>Ensaaios em semi-contínuo</i>	170
5.3.3	<i>Efeito do aumento da pressão na morfologia celular</i>	174
5.4	CONCLUSÕES	182
CAPÍTULO 6. RESPOSTA DA LEVEDURA <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> AO STRESSE OXIDATIVO.....		
	STRESSE OXIDATIVO.....	183
6.1	INTRODUÇÃO.....	186
6.1.1	<i>Breve referência Histórica</i>	186
6.1.2	<i>Resposta geral ao stresse</i>	186
6.1.3	<i>Stresse oxidativo</i>	188
6.1.4	<i>Mecanismos de defesa contra o stresse oxidativo</i>	193
6.1.5	<i>A levedura como modelo para o estudo do stresse oxidativo</i>	199
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	201
6.2.1	<i>Microorganismo e manutenção</i>	201
6.2.2	<i>Meios e condições de cultura</i>	201
6.2.3	<i>Condições de operação</i>	202
6.2.4	<i>Análise da morfologia por microscopia electrónica de varrimento</i>	204
6.2.5	<i>Monitorização</i>	206
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	207
6.3.1	<i>Efeito dos oxidantes no metabolismo celular</i>	207
6.3.2	<i>Efeito dos oxidantes na actividade das enzimas anti-oxidantes</i>	216
6.3.3	<i>Efeito da pressão na morfologia celular</i>	223
6.4	CONCLUSÕES	233

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO	235
7.1 CONCLUSÕES	236
7.2 PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO	240
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFIA	243
APÊNDICES.....	255
APÊNDICE A– CURVAS DE CALIBRAÇÃO	257

Lista de Tabelas

<i>Tabela 2.1 Algumas leveduras importantes do ponto de vista biotecnológico e suas aplicações industriais (segundo van Dijken et al., 1993; Walker, 1998).....</i>	<i>15</i>
<i>Tabela 2.2 Características de algumas leveduras não-Saccharomyces na tecnologia do ADN recombinado.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 2.3 Aplicações industriais de biomassa de levedura.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 2.4 Biomassa de leveduras não-Saccharomyces com aplicações biotecnológicas (segundo Boze et al., 1992).....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 2.5 Composição dos açúcares que constituem dois melaços industriais, em percentagem de sólidos totais (Weusthuis, 1994).....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 2.6 Classificação fisiológica das leveduras com base na ocorrência de fermentação alcoólica do açúcar.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 2.7 O efeito da pressão total moderada em culturas microbianas aeróbias.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 2.8 Métodos propostos para melhorar a taxa de transferência de oxigénio em bioprocessos.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 2.9 Correlações para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa de acordo com o sistema com o qual foram obtidas e respectivas referências bibliográficas.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 2.10 Efeito da pressão parcial de oxigénio no crescimento de culturas aeróbias.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 3.1 Equações para calcular os parâmetros de crescimento e de consumo.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 4.1 Composição do meio de cultura das estirpes de levedura Kluyveromyces marxianus.....</i>	<i>118</i>
<i>Tabela 4.2 Condições de operação nos ensaios efectuados em descontinuo com a levedura Kluyveromyces marxianus ATCC 10022.....</i>	<i>119</i>
<i>Tabela 4.3 Condições de operação nos ensaios efectuados em descontinuo com a levedura Kluyveromyces marxianus CBS 7894.....</i>	<i>120</i>
<i>Tabela 4.4 Valores da taxa de transferência de oxigénio (OTR) para o Biorreactor Whitey de 0.3 L. Valores médios \pm erro padrão.....</i>	<i>122</i>
<i>Tabela 4.5 Taxa específica de crescimento e produtividade máxima para os ensaios efectuados com a levedura Kluyveromyces marxianus ATCC 10022, com várias concentrações de lactose e com diferentes condições operacionais: micro-arejamento e pressão de ar.....</i>	<i>127</i>
<i>Tabela 4.6 Caracterização do gás utilizado nos ensaios efectuados e resultados obtidos para a taxa específica de crescimento e concentração celular máxima obtida em cada um dos ensaios.....</i>	<i>139</i>
<i>Tabela 5.1 Composição do meio de cultura de levedura Candida utilis CBS 621 para os ensaios realizados em descontinuo.....</i>	<i>155</i>
<i>Tabela 5.2 Composição do meio de cultura de Candida utilis CBS 621 para os ensaios realizados em semi-contínuo.....</i>	<i>157</i>

Tabela 5.3	Parâmetros de crescimento máximos obtidos nos ensaios com caudal de ar constante ($0.3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, PTN) para 1.2 bar, 3 bar e 6 bar de pressão de ar, rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$), rendimento em etanol ($Y_{E/S}$), taxa específica de crescimento (μ), taxa de consumo de substrato (q_s) e produtividade máxima, após 48 h (P_X)..	162
Tabela 5.4	Valores da taxa de consumo de oxigénio máximo ($OUR = q_{O_2} \cdot X$) das células de levedura <i>Candida utilis</i> CBS 621, para 0.5 g L^{-1} e para 10 g L^{-1} , baseada na taxa específica de consumo de oxigénio máxima (q_{O_2}) encontrada na literatura e determinada experimentalmente, e valores da taxa de transferência de oxigénio para cada valor de pressão (Biorreactor Whitey de 1 L)	167
Tabela 5.5	Parâmetros de tamanho (\bar{A}) e circularidade (F_{\max}/F_{\min}) para a levedura <i>Candida utilis</i> CBS 621 ao longo do tempo dos ensaios decorridos com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar (valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança).....	179
Tabela 6.1	Algumas defesas anti-oxidantes das leveduras (Santoro e Thiele, 1997; Walker, 1998; Costa e Moradas-Ferreira, 2001).....	194
Tabela 6.2	Composição do meio de cultura de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894	201
Tabela 6.3	Esquema do procedimento experimental para a preparação da amostra a ser analisada por microscopia electrónica de varrimento.....	205
Tabela 6.4	Actividade específica das enzimas anti-oxidantes, superóxido dismutase total (SOD), catalase (CAT) e glutathione reductase (GR), após 1 h, 8 h e 24 h de exposição aos químicos, paraquato (1 mM) e peróxido de hidrogénio (50 mM) sob duas condições de pressão: 1.2 bar e 6.0 bar de ar. Os níveis controlo foram considerados os que se obtiveram na experiência realizada com 1.2 bar de ar sem adição de químico (o desvio padrão não excedeu 10 %).....	217
Tabela 6.5	Actividade específica das enzimas anti-oxidantes, superóxido dismutase total (SOD), catalase (CAT) e glutathione reductase (GR), após 1 h, 8 h e 24 h de exposição aos químicos, paraquato (1 mM) e peróxido de hidrogénio (50 mM) sob duas condições de pressão: 1.2 bar e 6.0 bar de ar. Os níveis controlo foram considerados os que se obtiveram na experiência realizada com 1.2 bar de ar sem adição de químico (o desvio padrão não excedeu 10 %).....	221
Tabela 6.6	Tipos de morfologia que a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> pode apresentar	224
Tabela 7.1	Efeito da pressão total de ar (P), da pressão parcial de oxigénio (p_{O_2}) e pressão parcial de dióxido de carbono (p_{CO_2}) no comportamento metabólico das estirpes de leveduras estudadas na presente dissertação.....	239

Lista de Figuras

Figura 1.1 A natureza multidisciplinar da biotecnologia (Higgins, 1985).....	2
Figura 2.1 Diversidade de áreas que envolvem a biotecnologia das leveduras.....	16
Figura 2.2 Representação esquemática dos modos de operação em descontínuo (A), em semi-contínuo (B) e em contínuo (C) (Weusthuis et al., 1994).....	20
Figura 2.3 Representação esquemática do metabolismo de hexoses e dissacarídeos nas leveduras. 1. Dissacarídeo glucosidase; 2. Transportador da hexose; 3. Transportador do dissacarídeo; 4. Conversão da hexose em glucose-6-fosfato; 5. Enzimas glicolíticas; 6. Piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase; 7. Respiração mitocondrial; 8. Ciclo dos ácidos tricarboxílicos.....	27
Figura 2.4 Vias metabólicas de açúcares das células de leveduras (segundo Walker, 1998).....	28
Figura 2.5 Limitação da capacidade respiratória das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ilustrado como um estrangulamento respiratório. (a) etanol produzido reativamente; (b) etanol metabolizado oxidativamente; (c) etanol não metabolizado (segundo Sonnleitner e Kappeli, 1986).	34
Figura 2.6 Efeito da pressão total na actividade microbiana relativamente à actividade observada à pressão atmosférica. A actividade é analisada pela densidade de células expressa em número de células por mililitro (N) e concentração mássica de células (X), ou pelas taxas de crescimento (tx. cresc.) e reprodução (tx. reprod.) (Onken e Liefke, 1989).....	40
Figura 2.7 Efeito da pressão parcial de oxigénio na actividade celular de várias estirpes relativamente à pressão atmosférica, i.e., $p_{O_2}=210$ mbar. A actividade é analisada pela densidade de células expressa em número de células por mililitro (N) e concentração mássica de células (X) ou pelo rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) (Onken e Liefke, 1989).....	56
Figura 3.1 Esquema da instalação experimental – biorreactor Whitey de 0.3 L e acessórios: C – condensador, F – filtro de ar, R – rotâmetro de ar, VA – válvula anti-retorno, V1, V3 e V6 – válvulas tudo ou nada, V2 e V4 – válvulas de regulação, V5 – válvula agulha, T – transdutor de pressão.....	65
Figura 3.2 Fotografia do biorreactor Whitey de 0.3 L. Visualização dos transdutores de pressão e dos rotâmetros (A), e de dois biorreactores hiperbáricos Whitey de 0.3 L (B).....	65
Figura 3.3 Esquema da instalação experimental – biorreactor Whitey de 1 L e acessórios: CCM – controlador de caudal mássico, C – condensador, F – filtro de ar, R – rotâmetro de ar, VA – válvula anti-retorno, V1, V3 e V6 – válvulas tudo ou nada, V2 e V4 – válvulas de regulação, V5 – válvula agulha, T – transdutor de pressão.....	68
Figura 3.4 Fotografia do biorreactor Whitey de 1 L. Visualização dos reservatórios de ácido/base, do condensador e do registador de pH (A), e do biorreactores hiperbáricos Whitey de 1 L (B).....	68

Figura 3.5 Esquema da instalação experimental – biorreactor Parr e acessórios: A – agitador, A.R. – circuito de refrigeração, CCM – controlador de caudal mássico, D – disco de segurança, F – filtro de ar, G – garrafa de gás, M- motor do agitador, MCM – medidor de caudal mássico, Va – válvula anti-retorno, V1, V2, V3, V4 – válvulas, V5 – válvula de regulação, T – transdutor de pressão (Belo, 1999).....	70
Figura 3.6 Fotografia do biorreactor Parr.....	71
Figura 3.7 Esquema do procedimento da técnica de Análise de Imagem para a obtenção das propriedades individuais das células de levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894 e <i>Candida utilis</i> CBS 621. No caso da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894 não foi determinado o número de células gemulantes, nem o número de células simples, apenas o número de células totais.	89
Figura 3.8 Imagem de uma fotografia de microscopia de fluorescência de células <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894, coradas com alaranjado de acridina (Ampliação microscópica de 400x).	91
Figura 3.9 Representação esquemática do sistema reaccional utilizado para analisar a o conteúdo em ATP intracelular. ..	97
Figura 3.10 Representação esquemática do sistema reaccional utilizado para analisar a actividade da SOD.	102
Figura 3.11 Representação esquemática da reacção catalisada pela glutathione reductase e da reacção com o DTNB.	104
Figura 4.1 Inibição da utilização do dissacarídeo (por exemplo, através do transporte do açúcar) como possível causa de ocorrência do efeito de Kluver nas leveduras (Weunthuis, 1994).	113
Figura 4.2 O metabolismo da lactose na levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	114
Figura 4.3 Variação da biomassa (A), etanol (B) e lactose (C) ao longo do tempo de fermentação, com 2 bar, 4 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreactor Whitey de 0.3 L, com uma concentração inicial de sacarose de 20 g·L ⁻¹ (A ₂₀ , B ₂₀ e C ₂₀), 40 g·L ⁻¹ (A ₄₀ , B ₄₀ e C ₄₀) e 100 g·L ⁻¹ (A ₁₀₀ , B ₁₀₀ e C ₁₀₀).	123
Figura 4.4 Variação da percentagem de viabilidade, ao longo do tempo dos ensaios realizados com uma concentração inicial de lactose de (A) 20 g·L ⁻¹ e de (B) 100 g·L ⁻¹ com 2 bar, 4 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreactor Whitey de 0.3 L. São apresentados os valores médios ± intervalo com 95 % de confiança.	125
Figura 4.5 Variação da concentração específica de ATP por grama de peso seco, ao longo do tempo dos ensaios realizados com uma concentração inicial de lactose de (A) 20 g·L ⁻¹ e de (B) 100 g·L ⁻¹ com 2 bar, 4 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreactor Whitey de 0.3 L. São apresentados os valores médios ± intervalo com 95 % de confiança.	126
Figura 4.6 Efeito da pressão de ar nos rendimentos globais em biomassa (g·g _{lactose} ⁻¹) em etanol (g _{etanol} ·g _{lactose} ⁻¹), para diferentes concentrações de lactose: 20 g·L ⁻¹ , 40 g·L ⁻¹ e 100 g·L ⁻¹ . A percentagem de rendimento foi obtida a partir da razão entre a diferença da concentração celular final (máxima) e inicial, e a concentração de lactose correspondente. Valores médios ± erro padrão.	128
Figura 4.7 Variação da concentração celular (X), etanol (Et), glucose (S) e lactose (S), ao longo do tempo de fermentação. A figura A representa os ensaios realizados com 2 bar de pressão de ar e com micro-arejamento utilizando como fonte de carbono a glucose. A figura B representa os ensaios realizados com 2 bar de pressão de ar e com micro-arejamento utilizando como fonte de carbono a lactose. Os ensaios com 2 bar de pressão foram realizados no biorreactor Whitey de 0.3 L.	130

Figura 4.8 Variação da concentração celular, X (A), concentração de lactose, S (A) e concentração de oxigénio dissolvido (B), durante a cultura descontínua no biorreactor Biolab, à pressão atmosférica, a 30 °C, 1.5 L min ⁻¹ de caudal de arejamento (1 vvm), para a velocidade de agitação de 200 rpm e 400 rpm.....	132
Figura 4.9 Variação da concentração celular e de lactose ao longo do tempo dos ensaios, em descontínuo com uma concentração inicial de lactose de 10 g·L ⁻¹ , realizados com pressão de ar: 2 bar, 4 bar e 6 bar, e com arejamento.	133
Figura 4.10 Variação da concentração celular e lactose ao longo do tempo dos ensaios, em descontínuo com uma concentração inicial de lactose de 40 g·L ⁻¹ , realizados com pressão de ar: 2 bar, 4 bar e 6 bar, e com arejamento e micro-arejamento.	134
Figura 4.11 Efeito da pressão de ar no rendimento global em biomassa (g biomassa produzida·g lactose consumida ⁻¹) para diferentes concentrações de lactose: 10 g·L ⁻¹ e 40 g·L ⁻¹ . O valor de percentagem de rendimento foi obtido a partir da razão entre a diferença da concentração celular final (máxima) e inicial, e a concentração de lactose correspondente. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.	135
Figura 4.12 Efeito da pressão de ar na taxa específica de crescimento (μ) (barras) e na produtividade em biomassa (P_x) (círculos) para diferentes concentrações de lactose: 10 g·L ⁻¹ (barra branca e círculo branco) e 40 g·L ⁻¹ (barra cinzenta e círculo preto). A produtividade foi determinada a partir da concentração máxima obtida em cada ensaio, que era atingida após 32 h e 80 h do arranque dos ensaios, para 10 g·L ⁻¹ e 40 g·L ⁻¹ , respectivamente. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.	136
Figura 4.13 Variação da concentração celular e da concentração de lactose ao longo do tempo dos ensaios realizados com diferentes valores de pressão de ar, 2 bar e 6 bar e com a mistura de dióxido de carbono. Todos os ensaios foram realizados com uma concentração inicial de lactose de 10 g·L ⁻¹	138
Figura 4.14 Variação do pH ao longo do tempo dos ensaios realizados com diferentes valores de pressão de ar, 2 bar e 6 bar e com a mistura de dióxido de carbono. Todos os ensaios foram realizados com uma concentração inicial de lactose de 10 g·L ⁻¹	140
Figura 4.15 Actividade específica da enzima β -galactosidase de culturas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894 ao longo do tempo dos ensaios em descontínuo com pressão crescente de ar: 2 bar, 4 bar, e 6 bar, arejamento e micro-arejamento, com 10 g L ⁻¹ de lactose inicial.	142
Figura 4.16 Produtividade específica da enzima β -galactosidase de culturas de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894 em função de OTR. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.....	143
Figura 5.1 Diferentes formas do metabolismo de um dissacarídeo nas leveduras. A) Hidrólise extracelular do dissacarídeo seguido do transporte dos monossacarídeos, que é o caso da sacarose. B) Transporte do dissacarídeo seguido da hidrólise intracelular, que é o caso da lactose e da maltose (Weusthuis, 1994).	152
Figura 5.2 O efeito da pressão na taxa de transferência de oxigénio (OTR) e no coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio (k_{La}) no biorreactor Parr.	160

Figura 5.3 Variação da biomassa (A), etanol (B) e sacarose (C) ao longo do tempo de fermentação, com 1.2 bar, 3 bar e 6 bar de pressão de ar e no biorreactor Parr, com uma concentração inicial de sacarose de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com uma concentração inicial de biomassa de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ com o caudal de ar constante, $0.3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (PTN).....	161
Figura 5.4 Variação da biomassa (A), etanol (B) e sacarose (C) ao longo do tempo de fermentação, com 1.2 bar, 3 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreactor Whitey de 1 L, com uma concentração inicial de sacarose de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e com uma concentração de biomassa inicial de $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	164
Figura 5.5 Variação da concentração celular, concentração de etanol, concentração de sacarose e concentração de oxigénio dissolvido, durante a cultura descontínua no biorreactor Biolab, à pressão atmosférica, a 30°C , 400 rpm e $1.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (1vvm) de caudal de arejamento.	166
Figura 5.6 Variação da biomassa (A), etanol (B) e sacarose (C) ao longo do tempo de fermentação, com 1.2 bar, 3 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreactor Whitey de 1 L, com uma concentração inicial de sacarose de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e com uma concentração de biomassa inicial de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	168
Figura 5.7 O efeito da pressão na taxa de transferência de oxigénio (OTR) e no coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio (k_La) no biorreactor Whitey de 1L.	170
Figura 5.8 Variação da biomassa (A), etanol (B) e sacarose (C) ao longo do tempo de fermentação em semi-contínuo para as experiências realizadas no biorreactor Parr, com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar, com D igual a 0.025 h^{-1} e com $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose na alimentação. Símbolos pretos: $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e Símbolos brancos: $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentração celular inicial.	171
Figura 5.9 Variação da produtividade em biomassa ao longo do tempo de fermentação em semi-contínuo para os ensaios realizados no biorreactor Parr, com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar, para um perfil de alimentação a taxa de diluição constante e igual a 0.025 h^{-1} , com $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose na alimentação e com $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentração celular inicial.....	173
Figura 5.10 Comparação na evolução do tempo de fermentação em semi-contínuo para os ensaios realizados no biorreactor Parr da taxa específica de crescimento (μ) e da taxa específica de consumo de sacarose (q_s) para um perfil de alimentação a taxa de diluição constante e igual a 0.025 h^{-1} , com $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose na alimentação, para as três pressões de ar estudadas (1 bar, 6 bar e 12 bar).....	174
Figura 5.11 Microscopia de contraste de fase (Ampliação microscópica $400\times$). Alterações morfológicas na levedura <i>Candida utilis</i> CBS 621 em cultura semi-contínua. Amostras correspondentes aos tempos 3 h e 43h. (A) 1 bar de ar; (B) 6 bar de ar; (C) 12 bar de ar.	175
Figura 5.12 Variação da percentagem de células simples e de células gemulantes ao longo do tempo dos ensaios realizados em semi-contínuo, para as pressões de ar: 1 bar, 6 bar e 12 bar (valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança).	177
Figura 5.13 Distribuição da frequência de tamanhos, área, das células de levedura <i>Candida utilis</i> CBS 621, ao longo do tempo dos ensaios decorridos com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar.	178
Figura 5.14 Distribuição da frequência de circularidade, $F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$ das células de levedura <i>Candida utilis</i> CBS 621, ao longo do tempo dos ensaios decorridos com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar.	180

Figura 6.1 A célula de levedura detecta os vários tipos de stresse e são desencadeadas respostas específicas e gerais a estas condições de stresse impostas à célula. Estas respostas resultam em alterações tanto ao nível enzimático como ao nível da expressão genética e levam à aquisição de tolerância ao stresse imposto. O controlo do stresse tem um papel fundamental na regulação do crescimento celular (segundo Mager e Hohmann, 1997).....	187
Figura 6.2 (A) Interconversão das espécies reactivas de oxigénio nos sistemas químicos e biológicos (Adaptado de Singh, 1989); (B) Activação da molécula de O ₂ (Gille e Sigler, 1995).....	190
Figura 6.3 As espécies reactivas de oxigénio (ERO) provocam diversos danos celulares (Santoro e Thiele, 1997).....	193
Figura 6.4 Representação esquemática da reacção catalisada pela SOD.....	195
Figura 6.5 Ensaio realizados para estudar o efeito de vários agentes indutores de stresse oxidativo na levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894.....	202
Figura 6.6 Variação da concentração celular (A) e da lactose (B) ao longo do tempo de exposição aos oxidantes químicos, paraquato (1 mM) e peróxido de hidrogénio (50mM) para 1.2 bar e 6.0 bar de ar. Os dois controlos realizados não tinham adição de químico.	208
Figura 6.7 Variação da viabilidade celular ao longo do tempo de exposição aos oxidantes químicos, paraquato (1 mM) e peróxido de hidrogénio (50mM) para 1.2 bar e 6.0 bar de ar. Os dois controlos realizados, com 1.2 bar e 6 bar de ar não tinham adição de químico. São apresentados os valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança.....	210
Figura 6.8 Variação da concentração celular (A) e da lactose (B) ao longo do tempo de exposição à pressão de oxigénio puro, 1.2 bar e 4.0 bar; e de ar, 10 bar.....	211
Figura 6.9 Variação da viabilidade celular ao longo do tempo de exposição à pressão de oxigénio puro, 1.2 bar e 4.0 bar, e de ar, 10 bar. São apresentados os valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança.....	212
Figura 6.10 Variação da concentração celular (A) e da lactose (B) ao longo do tempo de exposição à pressão de oxigénio puro: 2.0 bar, 4.0 bar e 6 bar; e de ar: 10 bar. Nestes ensaios as células de levedura cresceram durante 15 h sob uma pressão de ar de 1.2 bar de ar, e foram depois submetidas a outra pressão de O ₂ puro ou de ar. ...	214
Figura 6.11 Variação da viabilidade celular ao longo do tempo de exposição à pressão de oxigénio puro: 2 bar, 4.0 bar e 6 bar; e de ar: 10 bar; após 15 h de pré-tratamento com 1.2 bar de ar. São apresentados os valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança.	215
Figura 6.12 Valores da taxa específica de crescimento (μ) para cada um dos ensaios realizados com e sem pré-tratamento. Experiências realizadas sem pré-tratamento: 1.2 bar, 4.0 bar de oxigénio puro e 10 bar de ar. Experiências realizadas com pré-tratamento: 1.2 bar de ar + (2 bar, 4.0 bar e 6 bar de oxigénio puro e 10 bar de ar).	216
Figura 6.13 Microscopia de contraste de fase. Alterações morfológicas na levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894 após tratamento com pressão. Amostras correspondentes ao tempo 24 h (Ampliação microscópica 630x). (A) 1.2 bar de ar; (B) Micro-arejamento em matraz; (C) 1.2 bar de oxigénio puro; (D) 1.2 bar de ar + 4 bar de oxigénio puro; (E) 1.2 bar de ar + 6 bar de oxigénio puro.....	226
Figura 6.14 Microscopia electrónica de varrimento. Alterações morfológicas na levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894 após tratamento com pressão. Amostras correspondentes ao tempo 24 h. Ampliação de 10000x. (A) 1.2 bar de ar; (B) Micro-arejamento em matraz; (C) 1.2 bar de oxigénio puro; (D) 1.2 bar de ar + 4 bar de oxigénio puro; (E) 1.2 bar de ar + 6 bar de oxigénio puro.....	227

- Figura 6.15 Distribuição de tamanhos, área, das células de levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, ao longo do tempo dos ensaios, com micro-arejamento, 1.2 bar de ar, 1.2 bar de oxigénio puro e 6 bar de oxigénio puro, para as amostras recolhidas após 15 h (A) e 40 h (B).....230
- Figura 6.16 Distribuição da frequência de circularidade, F_{\max}/F_{\min} , das células de levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, ao longo do tempo dos ensaios, com micro-arejamento, 1.2 bar de ar, 1.2 bar de oxigénio puro e 6 bar de oxigénio puro, para as amostras recolhidas após 15 h (A) e 40 h (B).....231

Lista de Símbolos

LETRAS LATINAS

a	área interfacial de transferência por unidade de volume de líquido	L^{-1}
A	unidades de absorvência	
C^*	concentração de saturação de oxigénio no líquido	NL^{-3}
C_L	concentração de oxigénio dissolvido	NL^{-3}
D	taxa de diluição	T^{-1}
d	factor de diluição	
Et	concentração de etanol	ML^{-3}
f	fugacidade	$ML^{-1}T^{-2}$
F	caudal de alimentação	L^3T^{-1}
$F_{máx}$	comprimento do eixo maior da célula	L
$F_{mín}$	comprimento do eixo menor da célula	L
H_{O_2}	constante de Henry para o oxigénio	$MN^{-1}L^2T^{-2}$
k_L	coeficiente de transferência de oxigénio na fase líquida	LT^{-1}
k_{La}	coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio	T^{-1}
L	comprimento	L
N	número de células por unidade de volume	L^{-3}
P	pressão total	$ML^{-1}T^{-2}$
P_0	potência dissipada pelo agitador	ML^2T^{-3}
p_{O_2}	pressão parcial do oxigénio	$ML^{-1}T^{-2}$
p_{CO_2}	pressão parcial do dióxido de carbono	$ML^{-1}T^{-2}$
P_x	produtividade em biomassa	$ML^{-3}T^{-1}$
q_{O_2}	taxa específica de consumo de oxigénio	$NM^{-1}T^{-1}$
q_s	taxa específica de consumo de substrato	$NM^{-1}T^{-1}$
S	concentração de substrato	ML^{-3}
t	tempo	T

$t_{1/2}$	tempo de meia vida	T
T	temperatura	Θ
V	volume	L^3
u_g	velocidade superficial do gás	LT^{-1}
x	fracção molar	
X	concentração celular	ML^{-3}
y_{O_2}	fracção molar na fase gasosa	
$Y_{E/S}$	rendimento mássico em etanol por substrato	
$Y_{X/S}$	rendimento mássico em biomassa por substrato	

LETRAS GREGAS

μ	taxa específica de crescimento	T^{-1}
β	valor do declive	
ε	coeficiente de extinção molar	L^2N^{-1}
ν	volume molar parcial	L^3N^{-1}

ÍNDICES

a	amostra
B	branco
e	entrada
f	final
F	na alimentação
i	componente, soluto ou instante de tempo
I	solução de iodo
j	componente líquido
0	inicial
s	saída
SO_3	solução de sulfito
t	total

EXPOENTES

*	saturação
<i>máx</i>	máximo

SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CBO	Carência Bioquímica de Oxigénio
CBS	Centraal Bureau voor Schimmelcultures
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
ERO	Espécies Reactivas de Oxigénio
GSSG	Glutationa oxidada
GSS	Glutationa reduzida
GR	Glutationa Reductase
GRAS	Generally recognized as safe (geralmente reconhecido como seguro)
HMP	Hexose monofosfato
HPLC	High Pressure Liquid Cromatography (cromatografia líquida de alta resolução)
Hsps	Proteínas de choque térmico
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
OTR	Oxygen Transfer Rate (taxa de transferência de oxigénio)
OUR	Oxygen Uptake Rate (taxa de consumo de oxigénio)
pNPG	p-nitrofenol- β -galactósido
pNP	p-nitrofenol
PTN	Pressão e Temperatura Normais (1 bar e 0 °C)
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Tricarboxylic Acids (ácidos tricarboxílicos)

vvm	Volume de gás por volume útil de reaktor por minuto
URL	Unidades Relativas de Luz

NOTAS

De um modo geral, foram utilizadas as unidades do Sistema Internacional (SI). Recorreu-se várias vezes aos múltiplos e submúltiplos das unidades fundamentais e foram utilizadas algumas unidades que, embora não sejam do SI, são de uso corrente, sendo permitida pelo SI (ex: hora, h; litro, L; concentração celular, g·L⁻¹).

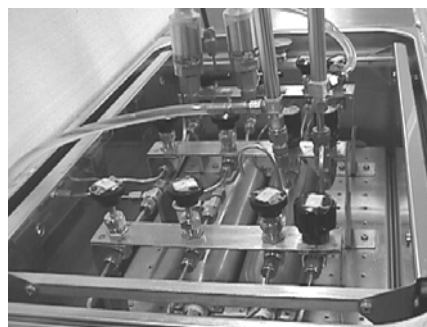
Foram ainda expressas algumas variáveis em unidades que, embora não sejam reconhecidas pelo SI, são de uso comum, pelo que foram adoptadas neste trabalho. Foi o caso da molaridade ($M = \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) para exprimir concentrações de soluções, bem como de percentagem volúmica (% v/v) e percentagem de peso por volume (% p/v) para designar a composição de misturas.

Capítulo 1

Introdução

"Biotechnology is often thought of consisting of only genetic engineering and monoclonal antibodies. To have such a narrow definition would be a mistake as it ignores the bulk of biotechnology, including some of the most successful areas."

Scragg, 1988



Capítulo 1

Introdução

Sumário

Dada a sua natureza multidisciplinar, a qual abrange variadas áreas desde a medicina até à engenharia electrónica, a importância da biotecnologia é largamente reconhecida.

Neste capítulo é feita uma breve abordagem à importância da biotecnologia e à sua evolução histórica, nomeadamente no que se refere à tecnologia das fermentações. Referem-se ainda as perspectivas futuras desta área, sendo apontadas algumas das suas aplicações práticas.

São referidos os principais objectivos do trabalho e, por último, descreve-se a estrutura da tese.

1.1 A Biotecnologia	2
1.2 Objectivos	6
1.3 Estrutura da tese	8

1.1 A biotecnologia

A biotecnologia tem sido definida de várias maneiras, a maior parte das vezes de uma forma insatisfatória, mas qualquer biotecnólogo afirmaria que a biotecnologia trata da aplicação de organismos, células ou partes das mesmas e análogos moleculares em processos ou sistemas industriais, para a obtenção de bens e serviços. De facto, a biotecnologia não existe como uma disciplina científica isolada, tratando-se de um campo multidisciplinar emergente, envolvendo uma grande variedade de áreas científicas distintas (Trevan, 1987), tal como demonstrado na Figura 1.1.

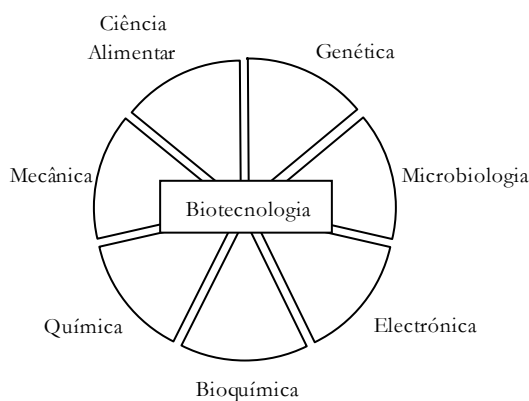


Figura 1.1 A natureza multidisciplinar da biotecnologia (Higgins, 1985)

Pode definir-se um processo biotecnológico como aquele em que há utilização de microrganismos (leveduras, bactérias, etc.) e/ou enzimas, podendo ter como objectivo a síntese de compostos químicos intracelulares (ex: proteínas) ou extracelulares (ex: antibióticos), a produção de biomassa (ex: fermento de padeiro, proteína microbiana), de alimentos (ex: bebidas), de energia (ex: biogás, etanol) ou ainda a despoluição de efluentes.

1.1.1 A história da biotecnologia

O Homem explora a biotecnologia há milhares de anos em diversas actividades, como é o caso da fermentação para a produção de pão, de vinho, da preservação e da modificação dos alimentos (ex. vinagre, queijo e molho de soja), da produção de sabão através da utilização de gorduras, entre muitos outros. (Higgins, 1985).

Desde a Antiguidade que os alimentos têm vindo a ser transformados por via biotecnológica, de forma a prolongar a sua vida útil e a melhorar as suas qualidades sensoriais. As enzimas são utilizadas na indústria alimentar para acelerar reacções químicas específicas (ex. produção de sumos mais límpidos). Os microrganismos são utilizados para transformar os alimentos através de fermentação láctica (bactérias lácticas), ou através da fermentação alcoólica (leveduras) (Macedo *et al.*, 2003).

Até há algumas décadas atrás, em vez do termo biotecnologia usavam-se outros, tais como microbiologia aplicada, bioquímica aplicada, tecnologia enzimática, bioengenharia, genética aplicada e biologia aplicada. A primeira destas áreas a ser desenvolvida foi a microbiologia aplicada, apesar do desconhecimento dos processos complexos que estavam envolvidos. Foi Pasteur quem, no final do século XIX, descobriu que eram os microrganismos os responsáveis pela fermentação, e provou que diferentes microrganismos originavam produtos também diferentes (Higgins, 1985). Assim, estavam definidas as bases para o subsequente desenvolvimento dos processos fermentativos industriais, tais como a produção de solventes orgânicos (ex. acetona, etanol, butanodiol, butanol, isopropanol) e também de outros químicos, a partir de diferentes espécies de microrganismos.

Segue-se a era dos antibióticos, com a produção de Penicilina, somente após cerca de 12 anos da sua descoberta por Fleming (Scragg, 1988). A descoberta de

medicamentos capazes de combater doenças infecciosas constitui uma das maiores realizações da biotecnologia pelo bem da Humanidade.

No entanto, um dos produtos, com maior importância industrial, obtido a partir da fermentação de culturas de microrganismos, continua a ser a biomassa ou proteína microbiana. As células de leveduras utilizadas na produção de proteína microbiana têm sido comercializadas desde o início do séc. XX, e foi durante a 1ª Guerra Mundial que a Alemanha utilizou a capacidade fermentativa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para produzir, à escala industrial, um produto com elevado teor proteico para consumo humano. Durante a 2ª Guerra Mundial, foram utilizados processos semelhantes, mas com a levedura *Candida utilis*. Todavia, foi só a partir dos anos 60 que foram desenvolvidos novos processos tecnológicos para a produção de proteína microbiana (SCP – *single cell protein*), para consumo do Homem e de animais (Higgins, 1985; Trevan, 1987).

1.1.2 Perspectivas futuras da biotecnologia

Nas últimas décadas, os progressos em engenharia genética, nomeadamente a tecnologia de ADN recombinado, impulsionaram significativamente o número de produtos de origem microbiana economicamente atractivos. A transferência, por manipulação genética, de genes de mamíferos para microrganismos tornou possível a produção, de uma forma mais rápida e eficiente, de produtos valiosos na área da medicina, como é o caso da insulina, do interferão humano e de hormonas de crescimento. Por exemplo, a produção da hormona de crescimento bovino, veio permitir aumentar mais rapidamente o peso dos animais e a produção leiteira. O melhoramento de plantas de interesse agrícola, por engenharia genética, tem envolvido o aumento da sua resistência às adversidades ambientais e tem melhorado o seu valor e a sua qualidade alimentar. O nível das expectativas da biotecnologia molecular elevou-se nos últimos tempos com o conhecimento do esboço da sequência do genoma humano (Sá-Correia *et al.*, 2003).

A biotecnologia continuará a evoluir no sentido de melhorar a qualidade de vida do Homem, através de uma variedade de serviços e bens. São vastos os sectores onde os processos biotecnológicos têm aplicação: a agricultura, o ambiente, a energia, e as indústrias química, alimentar e farmacêutica.

O desenvolvimento da biotecnologia dependerá fortemente de forças de mercado e do desenvolvimento de tecnologias competitivas. A chave para um bem sucedido desenvolvimento da biotecnologia está em produzir algo que não pode ser obtido de outra forma, ou como alternativa mais económica à produção de um produto já existente no mercado, ou como alternativa mais favorável à preservação do meio ambiente.

1.2 Objectivos

O presente trabalho vem no seguimento de um mestrado efectuado sob o título “Estudo do efeito da pressão de ar no comportamento fisiológico da levedura *Saccharomyces cerevisiae*”. Na mesma linha de investigação, com biorreactores pressurizados, pretendeu-se alargar o leque de microrganismos e introduzir outras leveduras, igualmente com interesse industrial.

O número de leveduras que tem sido utilizado na indústria ou com possíveis aplicações futuras é relativamente vasto; seleccionaram-se para este estudo duas destas leveduras: *Kluyveromyces marxianus* e *Candida utilis*. Estas leveduras foram seleccionadas para o presente estudo devido à sua aplicabilidade na indústria, e de serem reconhecidas como microrganismos GRAS (geralmente reconhecido como seguro).

O objectivo global do trabalho desenvolvido visa o estudo da utilização do aumento da pressão total de ar em biorreactores, especialmente para cultivo de células aeróbias, como forma de melhorar a capacidade de transferência de oxigénio para o meio, especialmente em culturas de elevada densidade celular. Foi numa perspectiva de maximização de produtividade e minimização de custos operatórios que se procurou demonstrar que a pressão constitui uma variável ambiental a ter em conta nos problemas de optimização de bioprocessos, nos quais esteja envolvida a cultura de microrganismos.

Pretendendo-se propor a utilização de ar hiperbárico em alternativa a outras técnicas de oxigenação de culturas, foi comparado o comportamento das leveduras em biorreactor pressurizado com ar, com oxigénio puro e com micro-arejamento, à pressão normal.

No âmbito do estudo do comportamento microbiano face a condições supostamente adversas ao crescimento e à actividade geral das células, utilizou-se,

neste trabalho, também a pressão, como uma variável importante que pode afectar seriamente produtividades e rendimentos de muitos processos industriais, por poder dar origem a uma condição de stresse oxidativo. Neste contexto, estudou-se também a resposta de enzimas anti-oxidantes ao aumento da pressão de ar. De forma a contribuir para o estudo de alguns mecanismos de adaptação das leveduras a condições ambientais consideradas adversas, nomeadamente ao stresse oxidativo, também se utilizaram oxidantes químicos como agentes indutores de stresse, comparando-se o seu efeito com o efeito da pressão de ar.

1.3 Estrutura da tese

Esta dissertação está dividida em seis capítulos fundamentais.

A interligação entre a importância industrial de algumas leveduras e o efeito da pressão de gases é referida no capítulo 2. Nesta secção são referidas algumas aplicações industriais das leveduras designadas de não-*Saccharomyces*, sendo mencionados alguns dos parâmetros que influenciam o crescimento celular. Neste capítulo, é ainda abordado o conhecimento actual da importância da pressão, referindo-se a influência da pressão total de ar e da pressão parcial de oxigénio no metabolismo de vários microrganismos.

No capítulo 3, são descritas as instalações experimentais utilizadas na execução do trabalho laboratorial, assim como as metodologias e materiais gerais utilizadas nos ensaios realizados.

No capítulo 4, é apresentado o trabalho realizado com duas estirpes de leveduras *Kluyveromyces marxianus*, uma *Kluyver* positiva e outra *Kluyver* negativa para a lactose, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 1022 e *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, respectivamente. São descritas as condições operacionais utilizadas na cultura descontínua destas estirpes e são apresentados os resultados que ilustram o efeito do aumento da pressão de ar no metabolismo e na viabilidade celular das células. São discutidas as diferenças encontradas entre estas duas estirpes.

O capítulo 5 refere-se ao trabalho realizado com a levedura *Candida utilis* CBS 621. Neste trabalho, estudou-se o efeito da pressão total de ar e da concentração celular inicial em cultura descontínua e também em cultura semi-contínua no comportamento metabólico desta estirpe. Neste trabalho foram utilizados dois biorreactores hiperbáricos diferentes. De modo a pesquisar possíveis alterações morfológicas da levedura, recorreu-se à técnica de análise de

imagem, para processamento de imagens de células obtidas nas diferentes condições de pressão.

No capítulo 6, é apresentado o estudo do efeito de vários agentes geradores de espécies reactivas de oxigénio, como o peróxido de hidrogénio, o paraquato, a pressão de ar e de oxigénio puro na actividade das enzimas anti-oxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione reductase, em células de levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894. Foi ainda estudada a capacidade de adaptação das células à pressão de oxigénio puro, quando previamente expostas a uma baixa pressão de ar durante a fase exponencial de crescimento. Da mesma forma que o capítulo anterior, também se recorreu à técnica de análise de imagem, e a técnicas de microscopia electrónica, para um estudo mais aprofundado da morfologia celular.

No capítulo 7, são sumariadas as principais conclusões deste trabalho e apontadas algumas sugestões de trabalho futuro.

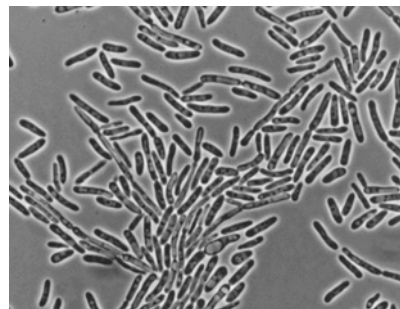
Capítulo 2

As leveduras e a pressão: revisão bibliográfica

"A decade or so ago, there was a considerable interest in developing single cell protein production from raw materials.

Many factors have influenced the development of fodder yeast technology, notable the biochemistry and physiology of the yeast."

Boze *et al.*, 1992



Capítulo 2

As leveduras e a pressão: revisão bibliográfica

Sumário

Neste capítulo faz-se uma breve revisão bibliográfica sobre a importância industrial das leveduras designadas de não-*Saccharomyces*, dando-se mais relevo às leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Candida utilis*. São referidos alguns exemplos de aplicação industrial destas leveduras.

São também descritos alguns dos parâmetros que influenciam o metabolismo das leveduras, nomeadamente alguns aspectos fisiológicos do metabolismo, parâmetros físico-químicos e necessidades nutricionais.

Devido à importância do oxigénio nos processos aeróbios, dá-se especial relevo à utilização da pressão nestes processos, discutindo-se as consequências do aumento da pressão parcial de gases dissolvidos na fisiologia microbiana.

2.1 A importância industrial das leveduras	14
2.2 Os parâmetros que influenciam o crescimento celular	26
2.3 A Pressão	38

2.1 A importância industrial das leveduras

2.1.1 As leveduras na indústria

É longa a história de associação das leveduras ao desenvolvimento da civilização, englobando aquelas, o principal grupo de microrganismos explorado pelo Homem. As leveduras têm uma grande diversidade de aplicações industriais, como por exemplo na indústria alimentar e cervejeira, e são também fornecedores de enzimas, proteínas e componentes químicos. Recentemente, a importância industrial das leveduras também se estendeu ao sector da saúde (biosensores, bioterapêutica, biofarmácia) (Walker, 1998), estando ainda presentes na área ambiental, como por exemplo no tratamento de efluentes industriais (Choi e Rhee, 1999).

As leveduras têm a vantagem de serem organismos unicelulares de rápido crescimento e de fácil manipulação genética. A família das leveduras engloba cerca de 500 espécies com diversas actividades metabólicas. Muitas leveduras têm sido utilizadas na alimentação e são culturalmente e legalmente aceites para o consumo humano (Boze *et al.*, 1992; Walker, 1998).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a estirpe mais conhecida do seu grupo devido à sua vasta utilização, nomeadamente no fabrico de fermento de padeiro, de vinho e de cerveja. De facto, os termos “levedura” e *Saccharomyces cerevisiae* são utilizados muitas vezes como sinónimos. No entanto, as leveduras da espécie *Saccharomyces* são das poucas leveduras fermentativas que são capazes de crescer em condições de anaerobiose, enquanto que leveduras fermentativas dos géneros *Kluyveromyces* e *Candida* necessitam de quantidades substanciais de oxigénio para o seu metabolismo (Weusthuis, 1994).

Na década passada, outras leveduras para além da levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm ganho interesse industrial na biotecnologia moderna. Na Tabela 2.1

estão sumariados alguns exemplos de aplicações industriais de leveduras para além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 2.1 Algumas leveduras importantes do ponto de vista biotecnológico e suas aplicações industriais (segundo van Dijken *et al.*, 1993; Walker, 1998)

Levedura	Aplicações actuais e perspectivas futuras
<i>Candida</i> spp.	Grande variedade de utilizações dependendo da espécie. Alguns exemplos: <i>Candida albicans</i> : ácido-6-aminopenicilânico e vitamina B6 a partir de hidrocarbonetos; <i>Candida maltosa</i> : proteína microbiana a partir de ácidos gordos e alcanos; <i>Candida pelliculosa</i> : proteína microbiana a partir de materiais celulósicos; <i>Candida utilis</i> : variedade de produtos, cresce em xilose; tecnologia de ADN recombinado.
<i>Hansenula polymorpha</i>	Levedura metilotrófica utilizada na expressão de genes heterólogos.
<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>	Fermentam a lactose e o polifructosano; fermentam o cacau; sintetizam várias enzimas: lactase, pectinase, etc.; candidatas à tecnologia de ADN recombinado.

Embora a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tenha sido descrita como o microrganismo ideal na expressão de genes heterólogos, existem alguns aspectos negativos na sua utilização. Estes problemas podem ser ultrapassados através do recurso a outras leveduras para além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que possuem determinadas características que as tornam vantajosas relativamente àquela, do ponto de vista comercial e económico. Por exemplo, as leveduras do género *Kluyveromyces* apresentam a característica de fermentarem a lactose e de crescerem em fontes de carbono económicas, como é o caso do soro de queijo. Estas culturas apresentam elevada densidade celular cujos plasmídeos endógenos,

podem ser, posteriormente, utilizados como vectores na manipulação genética (Walker, 1998).

A Figura 2.1 descreve, de um modo geral, a aplicação biotecnológica das leveduras em diversas áreas científicas.

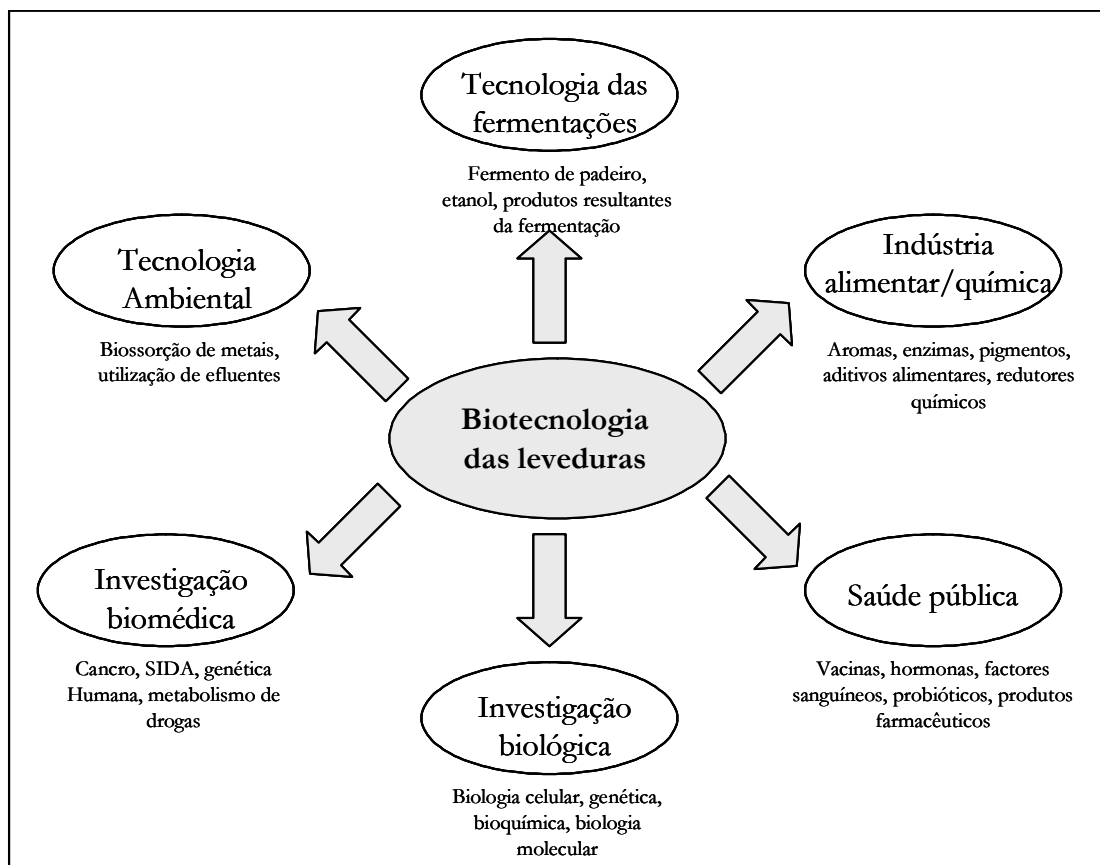


Figura 2.1 Diversidade de áreas que envolvem a biotecnologia das leveduras.

2.1.2 Engenharia genética

A engenharia genética tem revolucionado diversas áreas da biologia, fazendo com que as células de levedura estejam na dianteira de muitos dos desenvolvimentos alcançados na biotecnologia moderna.

Embora as células de levedura, em particular a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sejam descritas como sendo ideais como hospedeiros na expressão de genes heterólogos, existem alguns aspectos deste microrganismo que são considerados negativos na tecnologia de ADN recombinado, entre os quais se destacam, a incompatibilidade de algumas proteínas desta levedura com as glico-proteínas humanas com fim terapêutico e o facto da maior parte das proteínas heterólogas se acumularem intracelularmente e não extracelularmente, o que acarreta elevados custos nos processos de separação. Estes problemas podem ser facilmente ultrapassados, se for utilizada uma estirpe de células que tenha características fisiológicas e moleculares semelhantes, ou então recorrendo a microrganismos alternativos à levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A potencial aplicação destas leveduras em muitas empresas biotecnológicas já era esperada no século XX (Walker, 1998), sendo corrente a utilização destas leveduras como organismos hospedeiros para a produção de proteínas humanas recombinantes.

Um crescente número de leveduras designadas de não-*Saccharomyces* tem sido utilizado como hospedeiros, na engenharia genética, para a clonagem de genes. Estas leveduras, designadas de não-convencionais, exibem determinadas características particularmente vantajosas na tecnologia de ADN recombinado (Choi e Rhee, 1999; Walker, 1998). Algumas destas características são apresentadas na Tabela 2.2.

Segundo Choi e Rhee (1999), o aspecto mais atractivo da utilização deste tipo de leveduras como organismos hospedeiros na engenharia genética é a garantia, que lhes está inerente, como microrganismos seguros na sua aplicação em alimentos, garantindo desta forma a segurança da saúde pública.

Tabela 2.2 Características de algumas leveduras não-*Saccharomyces* na tecnologia do ADN recombinado

Levedura	Características
<i>Candida maltosa</i>	Capaz de assimilar fontes de carbono rapidamente: n-alcenos e ácidos gordos. Pode ser utilizada na optimização da biotransformação e no transporte intracelular dos compostos orgânicos hidrofóbicos.
<i>Hansenula polymorpha</i>	Ausência do efeito de <i>Crabtree</i> e capaz de crescer a 45 °C. Pode tanto excretar proteínas como acumular proteínas potencialmente tóxicas nos peroxissomas.
<i>Kluyveromyces</i> spp.	Capazes de fermentar a lactose e crescer em fontes de carbono económicas, como o soro de queijo. Originam culturas de elevada densidade celular ($\geq 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Contém plasmídeos endógenos que podem ser utilizados como vectores.

2.1.3 Tecnologia das fermentações

O termo fermentação deriva do verbo latino *fervere* que significa ferver e que é a aparência resultante da acção das leveduras em extractos de frutos ou em grãos de malte (Stanbury e Whitaker, 1984). Este efeito é consequência da libertação do dióxido de carbono durante o catabolismo anaeróbio de açúcares presentes nos extractos. O catabolismo de açúcares é um processo oxidativo que origina a redução de nucleótidos de piridina, os quais devem ser oxidados de novo para que o processo continue. Em condições aeróbias, esta oxidação ocorre via respiração em que o oxigénio é o aceitador final de electrões. Em anaerobiose, a oxidação dos nucleótidos de piridina está acoplada à redução de um composto orgânico que resulta da via catabólica. Assim, o termo fermentação tem sido usado com um significado estrito, para referir o processo de obtenção de energia, no qual os compostos orgânicos actuam quer como dadores, quer como aceitadores finais de electrões. Contudo, a palavra fermentação tem também sido

adoptada na indústria num sentido lato, para designar qualquer processo, anaeróbio ou aeróbio, no qual são utilizadas culturas microbianas para obter um determinado produto.

2.1.3.1 Modos de operação e tipos de biorreactores

Os biorreactores são um elemento crucial dos processos biotecnológicos, em que o custo global do processo depende grande parte da eficiência da sua operação. A operação de um biorreactor não pode ser entendida de uma forma isolada pois está, por um lado, fortemente dependente das características da cultura microbiana a utilizar e, por outro lado, condiciona as operações de separação e/ou purificação do produto obtido.

Pode dizer-se então que, embora o objectivo imediato de projectar um biorreactor seja maximizar a sua produtividade, não se pode deixar de ter em conta a sua integração com o processo de separação e/ou purificação do produto pretendido (Ferreira e Teixeira, 2003).

2.1.3.1.1 Modos de operação de um biorreactor

Dependendo do regime da alimentação, a operação dos biorreactores pode ser classificada em três tipos diferentes: descontínuo, semi-contínuo e contínuo.

Recorre-se ao modo de operação em descontínuo para estudar os fenómenos envolvidos na cinética de crescimento das células de microrganismos (Weusthuis *et al.*, 1994) ou, por exemplo, em formulações farmacêuticas (Ferreira e Teixeira, 2003), na medida em que é de extrema importância o controlo das condições de operação da cultura. Este modo de funcionamento permite a manipulação dos parâmetros de crescimento que afectam os fenómenos relacionados com o transporte. Não há adição de substrato para além do que foi colocado inicialmente, nem há remoção de meio de cultura até ao final do processo.

Na Figura 2.2 A é possível observar um comportamento tipicamente descontínuo de uma cultura de células em crescimento. Este comportamento é

descrito por um crescimento exponencial das células, durante o qual é atingida a taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$). Após o total consumo do substrato, esta decresce até atingir o valor zero.

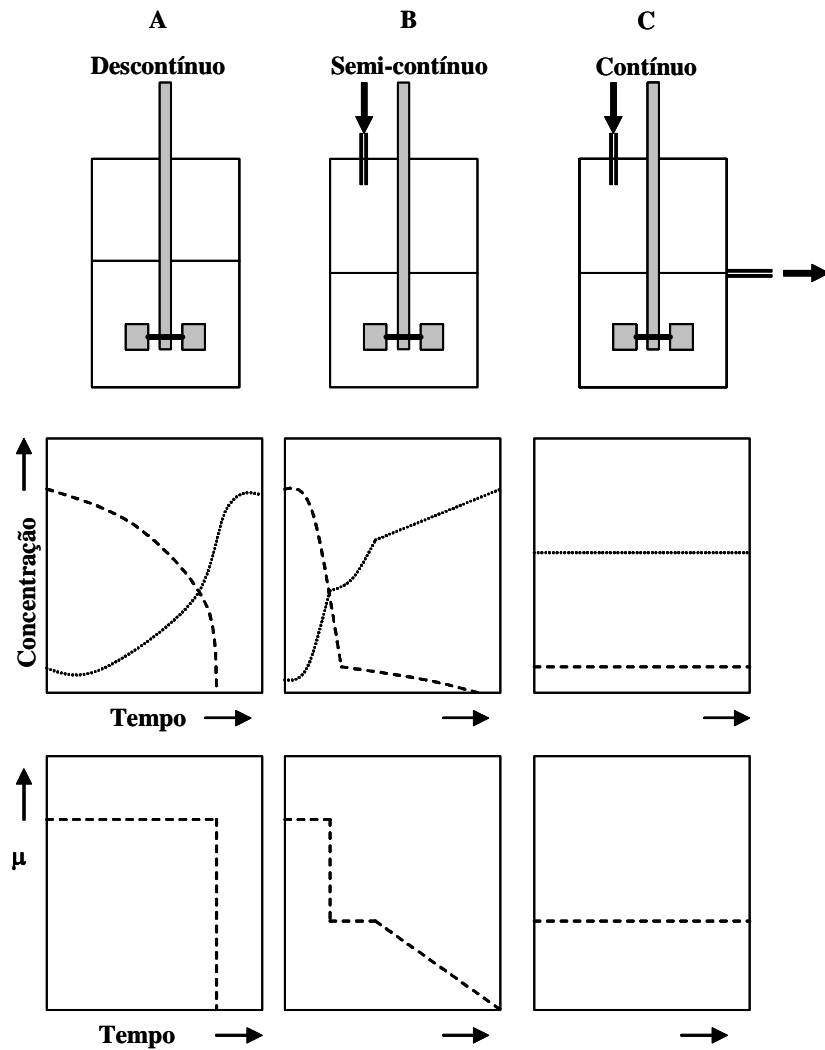


Figura 2.2 Representação esquemática dos modos de operação em descontínuo (A), em semi-contínuo (B) e em contínuo (C) (Weusthuis *et al.*, 1994).

Na operação em semi-contínuo (Figura 2.2 B), os substratos necessários ao crescimento são alimentados continuamente ou intermitentemente, sem remoção do meio de cultura. No início do processo, o reactor é operado em modo descontínuo e, no final, pode proceder-se à recolha de todo o meio ou à recolha

parcial, de modo a repetir este procedimento. Em sistemas nos quais se opera em semi-contínuo, pode atingir-se uma taxa específica de crescimento constante, mantendo uma alimentação de substrato exponencial, tendo em conta o aumento do volume da cultura e a concentração celular. Na prática, neste modo de operação, não se mantém uma taxa específica de crescimento constante, envolvendo um perfil de alimentação que leva a um contínuo decréscimo da taxa específica de crescimento (μ). Este perfil depende de diversos factores, entre os quais, a taxa de transferência de oxigénio para o meio de cultura. A produção de fermento de padeiro e a produção de antibióticos são exemplos de processos industriais que utilizam este tipo de operação.

Durante o modo de operação em contínuo (Figura 2.2 C), o qual decorre com adição contínua de meio de cultura, são atingidas as condições de estado estacionário, fazendo com que os parâmetros de crescimento sejam contínuos ao longo do tempo em que decorre o processo. Este tipo de operação é aplicado, por exemplo, na eliminação de poluentes em sistemas de lamas activadas.

2.1.3.1.2 Tipos de biorreactores

A complexidade e a diversidade de produtos obtidos por processos fermentativos sugerem a existência de reactores biológicos, ou de biorreactores, com variadas características. No entanto, é possível dividi-los em quatro grandes grupos, tendo em conta os principais factores que condicionam a operação de um biorreactor: o reactor agitado mecanicamente, a coluna de bolhas, o reactor com circulação induzida pelo ar e o reactor de leito empacotado ou de leito fixo.

O desempenho de um biorreactor depende de muitos factores, dos quais se podem enumerar os seguintes: 1) A concentração celular pretendida; 2) As condições de esterilidade que se pretendem manter até ao final do processo; 3) O tipo de agitação necessária para manter a homogeneidade de concentrações de produtos e reagentes; 4) A remoção ou a adição de calor; 5) A necessidade ou não de arejamento (Cliffe, 1988).

A selecção de um biorreactor está associada a um conhecimento profundo dos mecanismos de mistura e de transferência de massa envolvidos e a uma análise de custos detalhada. Na indústria alimentar e farmacêutica, predominam os reactores do tipo agitado. No entanto, em fermentações de baixa viscosidade em volumes grandes, deve ser escolhido um reactor com circulação induzida pelo ar. Pelo contrário, quando são atingidas viscosidades bastante elevadas, pode recorrer-se a um reactor agitado mecanicamente (Ferreira e Teixeira, 2003).

2.1.3.2 Aplicação industrial das leveduras

A definição de *levedura alimentar* foi inicialmente proposta por Jacquot e Biloraud em 1957 (Boze *et al.*, 1992). A definição refere que este tipo de levedura é aquela que foi morta e seca, que não possui actividade diastática e que não foi submetida a um processo de extracção nem recebeu qualquer aditivo. Este tipo de levedura deve possuir determinadas propriedades nutricionais em termos de conteúdo vitamínico, proteico e em aminoácidos, deve ser de fácil digestão e não deve conter substâncias tóxicas. Para além destes aspectos nutricionais, este tipo de levedura deve ser utilizado na produção industrial em larga escala. O custo deve ser competitivo comparativamente a outras fontes proteicas. Existem determinados aspectos que devem ser considerados na produção deste tipo de leveduras, como as condições de multiplicação, os substratos mais apropriados e os tratamentos subsequentes (Boze *et al.*, 1992).

A levedura alimentar, principalmente sob a forma de fermento de padeiro, representa a maior produção de qualquer microrganismo unicelular no mundo. São produzidos diversos milhões de toneladas de fermento de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) por ano, para ser utilizado na alimentação do Homem. Hoje em dia a produção de levedura para a confecção de pão (e de bebidas alcoólicas) tem-se desenvolvido numa indústria bastante sofisticada. Para além da utilização no pão, o fermento de padeiro também tem outras aplicações, assim

como têm os seus constituintes intracelulares que são extraídos da célula (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Aplicações industriais de biomassa de levedura

	Tipo de Produto	Aplicações
Produtos a partir da célula intacta	Levedura alimentar compactada	Panificação, produção de vinho
	Proteína microbiana	Ração animal
	Factor de crescimento	Probióticos animais e Humanos
	Minerais	Fonte de elementos traçador (Cr, Se)
	Cosméticos e farmácia	Factor de respiração da pele
	Pigmentação	Corantes
	Controlo biológico	Agentes antifúngicos na agricultura
	Controlo de poluição	Redução de CBO
Produtos extraídos das células	Extracto de levedura	Alimentação Humana e para meios de cultura microbiológicos
	Derivados de ARN	Indutores de aroma e utilização na indústria farmacêutica
	Parede celular	Alimentação Humana e utilização na indústria farmacêutica
	Vitaminas	Cápsulas para suplementos dietéticos
	Enzimas	Invertase e lactase (indústria alimentar)
	Proteínas recombinantes	Proteínas terapêuticas

A maior parte dos tipos de levedura alimentar advém de *Saccharomyces cerevisiae*, mas muitas outras leveduras têm o mesmo tipo de aplicação, para além de crescerem numa variada gama de substratos. Por exemplo, a levedura *Kluyveromyces marxianus* é utilizada em rações para animais depois de obtida ou crescida em soro de queijo, ou outros meios de cultura ricos em lactose. Outro exemplo é a levedura *Candida utilis*, que é utilizada como proteína microbiana, quando é cultivada em açúcares provenientes da madeira (Walker, 1998).

Técnicas de produção semelhantes e composições comparáveis levaram ao termo designado de proteína microbiana. A expressão proteína microbiana designa uma substância constituída por células de microrganismos secas, produzidas à escala industrial e utilizada como fonte de proteína na dieta alimentar do Homem e dos animais. No entanto, este termo não se aplica quando o conteúdo em proteína, do produto, é inferior a 65 %. Neste caso é usado o termo biomassa microbiana (Boze *et al.*, 1992). Ambos os termos, levedura alimentar e proteína microbiana, são utilizados para designar a biomassa de levedura com elevado teor proteico.

Estes três termos (levedura alimentar, proteína microbiana e biomassa microbiana) têm sido usados, um pouco arbitrariamente, e a sua utilização na literatura depende do autor que os refere e do contexto em causa.

Tabela 2.4 Biomassa de leveduras não-*Saccharomyces* com aplicações biotecnológicas (segundo Boze *et al.*, 1992)

Levedura	Aplicações biotecnológicas
<i>Kluyveromyces marxianus</i> e	Biomassa para rações animais a partir de soro de lactose.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Fontes de lactose
<i>Candida utilis</i>	Proteína microbiana a partir de licor de sulfito e açúcares da madeira
<i>Pichia pastoris</i> e <i>Hansenula polymorpha</i>	Proteína microbiana e proteínas recombinantes a partir do metanol
<i>Candida paraffinica</i>	Proteína microbiana a partir de n-alcanos

Hoje em dia, são utilizadas quatro espécies de leveduras na indústria alimentar: *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*, *Candida utilis* e *Kluyveromyces fragilis* (Choi e Rhee, 1999). *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada, uma vez que se encontra geneticamente caracterizada.

2.1.3.3 A composição de alguns meios de cultura industriais

A ecónomia dos processos industriais requer que as matérias-primas sejam baratas, o que depende da disponibilidade global e local, que sejam fáceis de armazenar, que tenham uma composição complexa de modo a satisfazerem o maior número possível de necessidades nutricionais do microrganismo, e que não tenham substâncias tóxicas. A fonte de carbono é particularmente crítica, pois este elemento constitui cerca de metade do peso seco da biomassa. Na indústria, recorre-se geralmente ao melaço, que é utilizado na indústria do fermento de padeiro como principal fonte de carbono; ou, por exemplo, à cana-de-açúcar, aos efluentes agro-industriais (soro de queijo, licor de sulfito), ao amido (licor de milho, batata doce) e aos materiais celulósicos (celulose e hemicelulose), que são fundamentalmente utilizados na produção de etanol (Weusthuis, 1994). O açúcar, presente em maior percentagem neste tipo de meios de cultura complexos, é um oligossacarídeo. Nos melaços da cana do açúcar e da beterraba, a sacarose é o seu principal constituinte (Tabela 2.5). Geralmente, os melaços são utilizados como matéria-prima principal na produção de biomassa, como é o caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da levedura *Candida utilis*. No caso do soro de queijo, a lactose é o açúcar presente em maior quantidade, existindo diversos microrganismos capazes de a metabolizar; é o caso das leveduras do género *Kluyveromyces* (Choi e Rhee, 1999).

Tabela 2.5 Composição dos açúcares que constituem dois melaços industriais, em percentagem de sólidos totais (Weusthuis, 1994)

Componente	Melaço de cana-de-açúcar	Melaço de beterraba
Sacarose (%)	45.5	63.5
Rafinose (%)	0.0	1.5
Açúcar invertido (%)	22.1	0.0
Outros (%)	5.5	1.5

2.2 Os parâmetros que influenciam o crescimento celular

2.2.1 Aspectos fisiológicos das leveduras

2.2.1.1 O metabolismo

O metabolismo das leveduras refere-se à assimilação e dissimilação bioquímica dos nutrientes pelas células, o que por sua vez engloba todos os passos das reacções enzimáticas, assim como a sua regulação. As vias assimilatórias e anabólicas são de consumo de energia, sendo portanto processos reductivos que levam à biossíntese de material celular novo. As vias dissimilatórias e catabólicas são processos oxidativos, a partir dos quais são removidos electrões dos intermediários para serem encaminhados para a geração de energia. Ambos os processos reductivo e oxidativo do anabolismo e do catabolismo são mediados por desidrogenases que utilizam, como cofactores redox, os elementos NADP e NAD, respectivamente (Walker, 1998).

A descrição pormenorizada das vias metabólicas dos açúcares simples encontra-se em várias obras da literatura (Moat e Foster, 1995; Walker, 1998). As principais vias metabólicas envolvidas na obtenção dos intermediários necessários à síntese celular são a via EMP (Embden-Meyerhof-Parnas), a via HMP (hexose monofosfato), o ciclo TCA (ciclo dos ácidos tricarboxílicos) e o ciclo do glioxilato.

Na Figura 2.3 apresenta-se um esquema simplificado do metabolismo de uma hexose e de um dissacarídeo. Numa primeira etapa, o metabolismo dos dissacarídeos pode ocorrer intra ou extracelularmente. Por exemplo, em *Candida utilis*, a sacarose é hidrolisada extracelularmente pela enzima invertase e as hexoses resultantes são subsequentemente transportadas por transportadores de

hexoses. Uma vez no meio intracelular, as hexoses são convertidas em glucose-6-fosfato, a partir do qual se produz o piruvato, através das enzimas da glicólise.

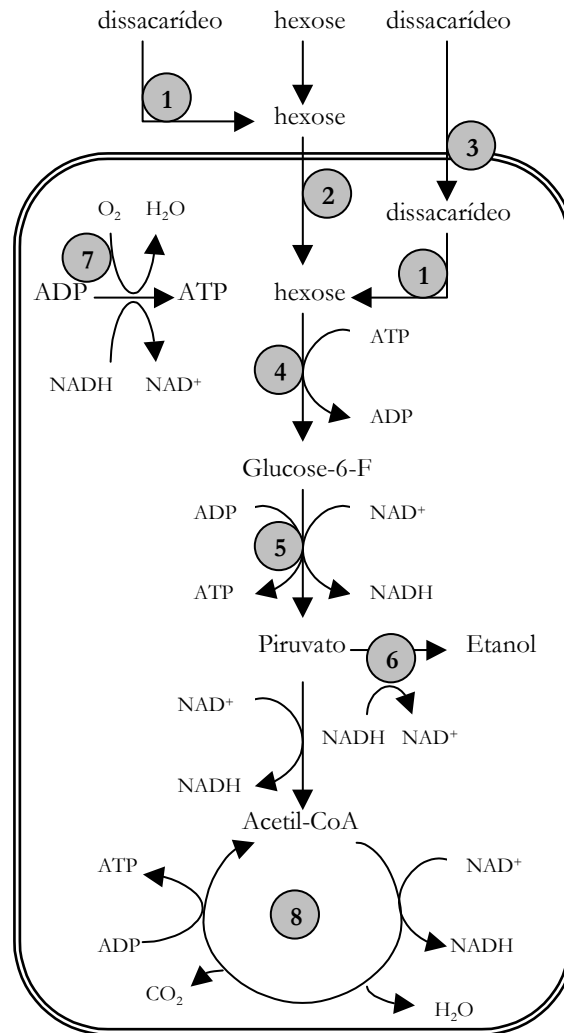


Figura 2.3 Representação esquemática do metabolismo de hexoses e dissacarídeos nas leveduras. 1. Dissacarídeo glucosidase; 2. Transportador da hexose; 3. Transportador do dissacarídeo; 4. Conversão da hexose em glucose-6-fosfato; 5. Enzimas glicolíticas; 6. Piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase; 7. Respiração mitocondrial; 8. Ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

Durante este processo metabólico produz-se energia (ATP) e equivalentes reduzidos (NADH). A energia, sob a forma de ATP, é utilizada na produção de biomassa e nos mecanismos de manutenção. O NADH produzido durante a glicólise pode ser oxidado a NAD⁺, através da conversão do piruvato em etanol, ou através da oxidação pelo oxigênio na cadeia respiratória. No processo da

respiração, o piruvato é convertido em dióxido de carbono e água no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Durante este processo, produzem-se equivalentes redox para a produção de ATP (Weusthuis, 1994).

Ambos os processos metabólicos, fermentativo e respiratório, são muito importantes em processos industriais. A fermentação é essencial para a produção de dióxido de carbono e etanol, enquanto a respiração favorece a produção de biomassa. Do ponto de vista biotecnológico, é extremamente importante classificar as leveduras relativamente à sua capacidade fermentativa e respiratória (Weusthuis, 1994). A Figura 2.4 resume as principais sequências de reacções destas duas importantes vias metabólicas do açúcar.

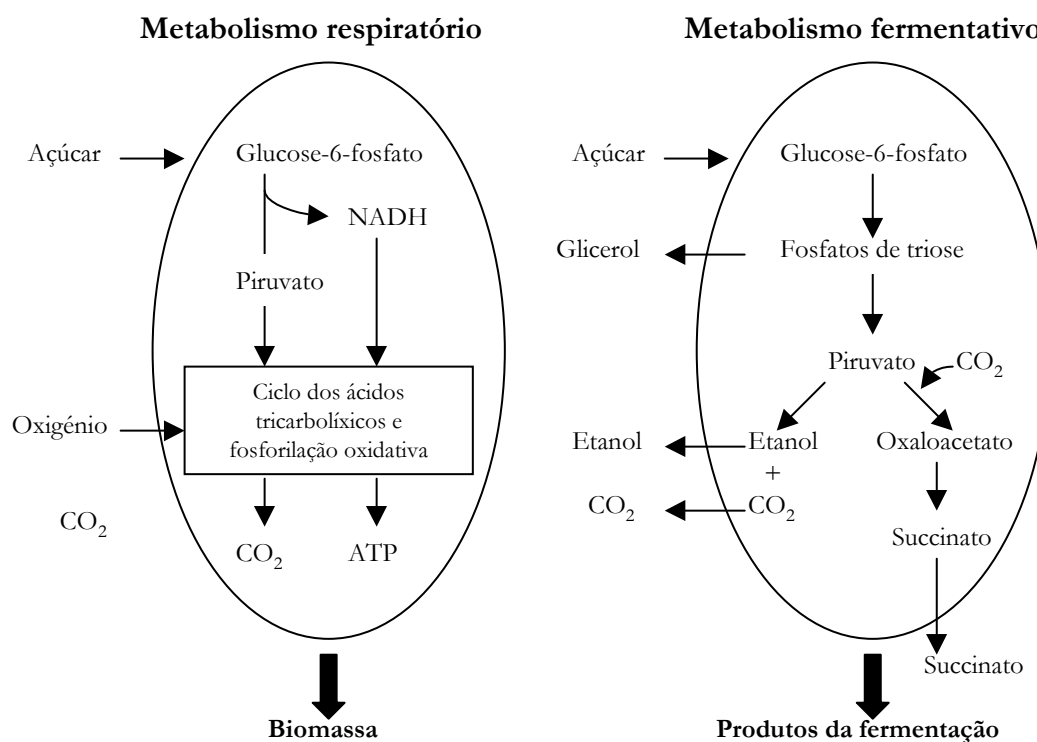


Figura 2.4 Vias metabólicas de açúcares das células de leveduras (segundo Walker, 1998)

O metabolismo do carbono durante o crescimento depende da estirpe de levedura, da fonte de carbono e das condições ambientais. De todos os factores ambientais que regulam o metabolismo respiratório e fermentativo nas células de levedura, a concentração de oxigénio e de glucose são os mais bem descritos na

literatura (Barford e Hall, 1979; Furukawa *et al.*, 1983; Rieger *et al.*, 1983; Abel *et al.*, 1994). Estes factores estão intimamente ligados a vários fenómenos de regulação.

2.2.1.2 Classificação das leveduras

Nas leveduras, as vias bioquímicas podem ser reguladas a vários níveis. Nestes, podem incluir-se a síntese enzimática (indução, repressão, desrepressão de genes), a actividade enzimática (activação alostérica, inibição de isoenzimas) e a distribuição celular (localização na mitocôndria das enzimas respiratórias) (Walker, 1998).

As leveduras podem ser divididas em três grupos de acordo com as suas capacidades fermentativas (Tabela 2.6) (Boze *et al.*, 1992; Weusthuis, 1994):

- Leveduras com um metabolismo fermentativo dominante (fermentativas obrigatórias): estas espécies fermentam a glucose e toleram muito dificilmente substratos não-fermentativos.
- Leveduras com metabolismo misto (fermentativas facultativas), respiratório e fermentativo. Estas, por sua vez, podem ser divididas em dois sub-grupos: leveduras sensíveis à glucose (*Crabtree* positivas), como é o caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*; e leveduras não sensíveis à glucose (*Crabtree* negativas), como é o caso da levedura *Candida utilis* e da levedura *Kluyveromyces marxianus*.
- Leveduras não fermentativas. Algumas leveduras, como por exemplo, algumas estirpes de *Rhodotorula*, não são capazes de realizar a fermentação alcoólica devido à incapacidade de sintetizar enzimas chave da via fermentativa.

Tabela 2.6 Classificação fisiológica das leveduras com base na ocorrência de fermentação alcoólica do açúcar

Classificação	Exemplos
Não fermentativas	<i>Rhodotorula rubra</i>
Fermentativas Facultativas	a. <i>Crabtree</i> positiva <i>Saccharomyces cerevisiae</i> b. <i>Crabtree</i> negativas <i>Candida utilis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Fermentativas Obrigatórias	<i>Candida slooffii</i>

2.2.1.3 Mecanismos de regulação

A regulação da fermentação e da respiração é controlada pelas condições ambientais, de que são exemplo, a ausência ou a presença de oxigénio, e o tipo e a concentração de substrato. A influência destas condições pode ser caracterizada através de quatro efeitos regulatórios do metabolismo: o efeito de *Pasteur*, o efeito de *Crabtree*, o efeito de *Custers* e o efeito de *Kluyver* (Weusthuis, 1994; Barnett, 1997; Walker, 1998).

- **Efeito de *Pasteur***

Este efeito aplica-se à indução da respiração pelo oxigénio, com a concomitante diminuição da actividade fermentativa das células (Ratledge, 1990). Contudo, este fenómeno só pode ser observado com pequenas concentrações de glucose, menos de 5 mM, em culturas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Barnett, 1997), ou em condições de limitação de determinados nutrientes e está associado a um decréscimo da afinidade do consumo do açúcar em condições aeróbias (Fiechter *et al.*, 1981). Esta afinidade tem sido vastamente estudada (Ratledge, 1990; Verduyn, 1991), e são vários os factores, quer intracelulares, quer extracelulares, que podem estar implicados no controlo do fluxo glicolítico das células de levedura e, conseqüentemente, na ocorrência do efeito de *Pasteur*.

As principais razões que explicam a ausência do efeito de *Pasteur* e a irrelevância energética do oxigénio em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* activas prendem-se com as concentrações repressivas da glucose disponível e com a ocorrência do efeito de *Crabtree* (Walker, 1998).

- **Efeito de *Crabtree***

O efeito de *Crabtree* pode ser definido como a ocorrência de fermentação alcoólica em condições aeróbias, na presença de excesso de açúcar. Se a concentração de glucose disponível é elevada, é inibido o efeito de *Pasteur*, dando vez à ocorrência do efeito de *Crabtree* (este fenómeno é, por isso, muitas vezes designado de efeito contra-*Pasteur*) (Walker, 1998).

- **Efeito de *Custers***

Este efeito é definido como uma inibição transitória da fermentação por anaerobiose; esta inibição é interrompida se forem adicionadas pequenas quantidades de oxigénio (Walker, 1998). Por exemplo, as leveduras do género *Brettanomyces*, *Dekkera* e *Eeniella* (importantes na fermentação da cerveja Belga) fermentam a glucose em etanol e acetato, em condições aeróbias (Barnett, 1997). No entanto, perante a transição para condições de anaerobiose, o crescimento e a fermentação são fortemente inibidos durante um período de tempo incerto (van Dijken e Scheffers, 1986). Quando se introduz oxigénio no meio de cultura, é retomada de imediato a fermentação alcoólica (Weusthuis, 1994).

- **Efeito de *Kluyver***

Em 1940, Kluyver confirmou alguns trabalhos anteriores, nos quais algumas leveduras tinham sido capazes de metabolizar hexoses de alguns dissacarídeos, em condições anaeróbias. No entanto, só em condições aeróbias, poderiam metabolizar os dissacarídeos (Barnett, 1997). Por exemplo, a levedura *Candida utilis* é capaz de fermentar a glucose e de crescer em maltose em condições aeróbias. No entanto, esta levedura não é capaz de fermentar a maltose, isto é, de

produzir etanol. Este efeito pode ser causado por uma diferença entre o metabolismo do dissacarídeo e o metabolismo da glucose (Weusthuis, 1994).

Esta incapacidade de fermentar dissacarídeos poderia ser causada por uma inactivação das hidrolases do açúcar na ausência de oxigénio (Kluyver e Custers, 1940). De facto, o transporte do açúcar é consideravelmente mais baixo em condições anaeróbias do que na presença de oxigénio. Barnett e Sims (1982) concluíram que o efeito de *Kluyver* não era somente causado pela necessidade em oxigénio na etapa de transporte de açúcar. Mais tarde, concluíram que este efeito poderia estar directamente relacionado com a baixa actividade da enzima piruvato descarboxilase, responsável pela reacção de conversão do piruvato em etanol.

Na produção de levedura alimentar, recorre-se sempre a estirpes que não têm o efeito repressivo da glucose no metabolismo respiratório, *i.e.*, *Crabtree* negativas (Tabela 2.6). São utilizadas frequentemente leveduras com fraco metabolismo fermentativo (Boze *et al.*, 1992).

A relevância biotecnológica do efeito de *Kluyver* prende-se com a produção de biomassa ou de proteínas heterólogas em meios de cultura económicos, como é o caso dos efluentes ricos em lactose e dos melaços ricos em sacarose, nos quais a principal fonte de carbono é um dissacarídeo. Assim, as leveduras que são fermentativas facultativas e que exibem este efeito, não necessitam de ser propagadas a partir de regimes em semi-contínuo, para prevenir a formação de etanol. Isto, porque o efeito de *Kluyver* previne a ocorrência de fermentação na presença de dissacarídeos (Walker, 1998).

Estas designações não são recomendadas por todos os autores. Barford e Hall (1979) e Fiechter e Seghezzi (1992), por exemplo, defendem que estes efeitos não descrevem fenómenos metabólicos generalizados, mas um dado estado da cultura em condições muito específicas, e não é simplesmente a presença do substrato *per se* a causa da repressão, mas também o fluxo de energia gerado pelo mesmo.

Têm sido continuamente estudadas por diversos investigadores (Barford e Hall, 1979; Furukawa *et al.*, 1983; Rieger *et al.*, 1983; Verduyn *et al.*, 1990b; Abel *et al.*, 1994), as condições extracelulares ótimas que levam à regulação do metabolismo, nomeadamente a concentração de glucose e de oxigénio. Foram realizadas experiências em descontínuo, em contínuo e em semi-contínuo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e foram encontrados os valores críticos de glucose e de oxigénio para os quais deixa de existir repressão, tanto para a produção de etanol (fermentação alcoólica) como para a produção de biomassa (respiração). Em conformidade com estes resultados, Barford (1990), Auberson e von Stockar (1992), Fiechter e Seghezzi (1992) e Schlosser *et al.* (1994) têm proposto modelos para controlar o fluxo metabólico de maneira a evitar a repressão catabólica. Sonnleitner e Kappeli (1986) representam a capacidade respiratória das células de levedura como um estrangulamento da utilização oxidativa do substrato (Figura 2.5).

Com fluxos de substrato (primeiro a glucose e depois o etanol) relativamente baixos, este é metabolizado oxidativamente e passa através da restrição ou estrangulamento - fluxo de substrato sub-crítico. Trata-se de um fluxo crítico, se o fluxo de substrato, glucose e etanol, preencher totalmente a restrição.

Existem duas situações de fluxo super-crítico: 1) Quando o fluxo de glucose excede o estrangulamento então, a parte residual de glucose que não passa é metabolizada redutivamente, com produção de etanol (Figura 2.5 a). Se existe etanol adicional, este não passa através do estrangulamento, pois encontra-se saturado de glucose. Assim, o etanol não é metabolizado (Figura 2.5 c). 2) O fluxo de glucose é sub-crítico, mas existe etanol adicional no meio. O etanol é metabolizado oxidativamente enquanto este passar através do estrangulamento (Figura 2.5 b). O etanol residual não pode ser metabolizado (Figura 2.5 c).

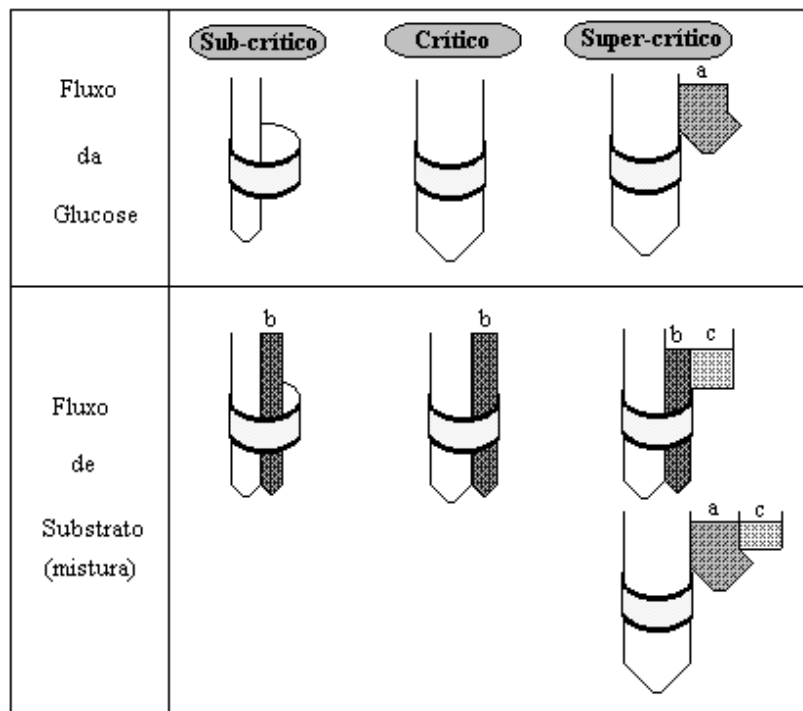


Figura 2.5 Limitação da capacidade respiratória das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ilustrado como um estrangulamento respiratório. (a) etanol produzido redutivamente; (b) etanol metabolizado oxidativamente; (c) etanol não metabolizado (segundo Sonnleitner e Kappeli, 1986).

Deste modo, Sonnleitner e Kappeli (1986) defendem também que se devem evitar expressões como “efeito de *Pasteur*” e “efeito de *Crabtree*”, propondo-se alternativas mais correctas - metabolismo oxidativo e oxidoreduativo. O crescimento é oxidativo sob condições de fluxo de substrato sub-críticas, e é oxidoreduativo sob condições aeróbias de fluxo de glucose crítica e super-crítica. O crescimento é redutivo apenas em condições anaeróbias. A glucose e o etanol podem ser metabolizados desde que a capacidade respiratória não seja excedida (fluxo sub-crítico sob determinadas condições de disponibilidade de oxigénio). Sob condições de fluxo super-crítico produz-se etanol.

2.2.2 Necessidades nutricionais das leveduras

As leveduras não são microrganismos muito exigentes em termos nutricionais, dependendo esta necessidade das condições do meio e do modo de crescimento.

O crescimento das leveduras está directamente relacionado com a presença de todas as substâncias necessárias à síntese de material celular e à produção de energia durante a biossíntese. As substâncias que compõem o meio de cultura devem estar em proporção com as que constituem as células. A quantidade e o tipo de nutrientes necessários às células variam com a respectiva estirpe de levedura (Boze *et al.*, 1992).

- **Carbono:** O carbono é o constituinte principal da célula com cerca de 50 % (p/p) do seu peso seco. A maior parte das fontes de carbono são hidratos de carbono, como a glucose, a frutose, a lactose, a sacarose, o hidrolisado de celulose e os n-alcanos. Os hidratos de carbono são os principais constituintes de muitos sub-produtos industriais, incluindo o soro de queijo, o melão ou o licor de sulfito.
- **Azoto:** O azoto é, quantitativamente, o segundo elemento mais importante, correspondendo a 10 % da composição celular. Normalmente é fornecido à célula como azoto inorgânico, na forma de sais amoniacais ou ureia, aminoácidos, péptidos ou pirimidinas. É essencial para a síntese proteica e como componente da parede celular. O amoníaco é o composto mais frequentemente utilizado nos meios de cultura, devido ao seu baixo custo e à grande facilidade da sua utilização. A ureia é também, por vezes, utilizada devido ao seu efeito de tampão.
- **Fósforo:** Este elemento é usado na forma de iões dihidrogenofosfato, H_2PO_4^- . Este elemento pode encontrar-se nos açúcares de fosfato, nos ácidos nucleicos, e nos nucleótidos di e trifosfato. Compõe cerca de 1.5 % do peso seco da célula.
- **Outros macro-elementos e vitaminas:** Os macro-elementos como o potássio, o magnésio e o sulfato entram na constituição de coenzimas, activadores de enzimas, e também na composição dos aminoácidos. As

vitaminas são compostos orgânicos que, por vezes, são necessários ao crescimento ou para a obtenção de um determinado rendimento celular.

- Elementos de baixa concentração: Os elementos como Fe, Mn, Mo, Zn, Co, Ni, B, Cl e Na são necessários em quantidades extremamente pequenas, na ordem das micromoles. Estes elementos entram na constituição das enzimas e das coenzimas e, quando em excesso, podem tornar-se tóxicos para as células.

2.2.3 Parâmetros físico-químicos

Existem diversos parâmetros físico-químicos que influenciam o crescimento das leveduras, como o meio de cultura, a temperatura, o pH e o oxigénio.

O metabolismo celular pode ser orientado para a via fermentativa ou para a via respiratória, conforme a composição do meio de cultura.

A temperatura tem grande influência na taxa de crescimento, no tipo de metabolismo, nas necessidades nutricionais e na composição em biomassa. Afecta também a estrutura dos componentes celulares, especialmente as proteínas e os lípidos, os mecanismos de regulação, as reacções enzimáticas e a permeabilidade celular. A temperatura óptima para a produção de biomassa de leveduras está localizada no intervalo de 25 °C a 38 °C (Boze *et al.*, 1992).

A concentração do ião hidrogénio presente no meio afecta a composição celular e o tipo de metabolismo. As células de levedura são capazes de crescer na gama de pH de 2.5 a 7.0. No entanto, meios de cultura com pH inferior a 4.0 minimizam o crescimento bacteriano, uma vez que para estes valores de pH o crescimento das bactérias é parcialmente inibido (Boze *et al.*, 1992).

O oxigénio é um dos parâmetros mais importantes na produção de biomassa principalmente quando se trata de leveduras aeróbias. A disponibilidade de oxigénio no meio de cultura é determinante na obtenção de energia pelas células através da oxidação dos compostos de carbono. Assim, a necessidade em

oxigênio também varia de acordo com a natureza da fonte de carbono e com a estirpe de levedura, dado que muitas são anaeróbias facultativas.

2.3 A Pressão

2.3.1 A pressão na indústria

Nos biorreactores industriais, os níveis e os gradientes de pressão total e parcial são consideravelmente maiores do que os que ocorrem à escala laboratorial. Numa gama de pressão relevante, que pode variar entre 2 ou 3 bar até um máximo de 10 bar, os efeitos da pressão total nas culturas aeróbias são consideravelmente baixos. No entanto, pressões parciais de dióxido de carbono na ordem dos 100 mbar poderão ter um efeito inibidor nas mesmas culturas aeróbias.

O crescimento de culturas aeróbias poderá ser melhorado através do aumento da pressão parcial de oxigénio acima dos 210 mbar (valor correspondente a 1 bar de pressão total de ar), no caso de existir limitação na transferência de oxigénio. Contudo, em muitos casos, o aumento da pressão parcial de oxigénio poderá levar a problemas de toxicidade para as células e inibir o seu crescimento, assim como a produção de produtos. Torna-se extremamente necessário aprofundar o conhecimento destes efeitos em processos de desenvolvimento, para ser possível e viável a sua transposição para a escala industrial (Onken e Liefke, 1989).

Em culturas à escala laboratorial a operar em descontínuo, concentrações de metabolitos, substratos e gases dissolvidos, variam com o tempo. Contudo, no caso de uma mistura eficiente, estes parâmetros não variam espacialmente. No entanto, com o aumento do tamanho dos biorreactores torna-se cada vez mais difícil de alcançar a homogeneidade das concentrações, e até da temperatura de operação (Sweere *et al.*, 1988). É ainda claramente mais complicado em reactores industriais a operar em contínuo. Uma forma de ultrapassar esta limitação poderá ser mediante a utilização de vários pontos de alimentação, ou através do aumento da velocidade de agitação. Quando se alimentam gases a um biorreactor, a

situação é bastante diferente, uma vez que, devido à elevada altura dos reactores industriais, a pressão a que as células estão sujeitas depende da posição em que se encontram dentro do reactor, sendo tanto maior quanto mais perto do fundo do reactor for o local. Isto, porque em cada ponto do sistema, a pressão total é resultado da soma da pressão de operação (normalmente igual à atmosférica ou superior) e a pressão hidrostática exercida pela coluna do líquido acima desse ponto. Assim, um reactor industrial que contém meio de cultura até 10 m de altura, com uma pressão total absoluta de 1.5 bar no topo do reactor, terá uma pressão de 2.5 bar no fundo do reactor; isto quer dizer que a solubilidade do oxigénio ou do dióxido de carbono será cerca de 70 % superior à do topo do reactor. Esta diferença é tanto maior quanto maior for a altura do líquido nos reactores, como, por exemplo, no caso do reactor *Pressure Cycle Fermenter*, na ICI, na produção de proteína microbiana a partir do metanol, que tem 60 m de altura. Outro exemplo que se pode referir é o caso do reactor BIOHOCH, na empresa HOECHST, na Alemanha, que tem 30 m de altura (Onken e Liefke, 1989).

2.3.2 Efeito da pressão total

A classificação da pressão em alta ou moderada é relativa, dependendo da área de investigação e da área de aplicação tecnológica. Quer na natureza quer em processos industriais, a pressão pode apresentar valores entre 1 bar e 1.000.000 bar. A separação das gamas de pressão foi adoptada em biologia por Johnson *et al.* (1954), que classificou em “muito altas” as pressões acima de 1000 bar e em “moderadas ou altas” as pressões com valores compreendidos entre a pressão atmosférica e 1000 bar.

2.3.2.1 Alta Pressão

Têm sido realizados vários trabalhos de investigação sobre o efeito da pressão total nos microrganismos, numa vasta gama de pressões. Na Figura 2.6 estão resumidos alguns resultados obtidos por diversos autores, sobre a variação da

actividade das células de microrganismos com a pressão. Através desta figura, é possível observar que muitos microrganismos conseguem sobreviver a pressões relativamente altas e que, em alguns casos, a actividade das células é estimulada a pressões elevadas (até 300 bar).

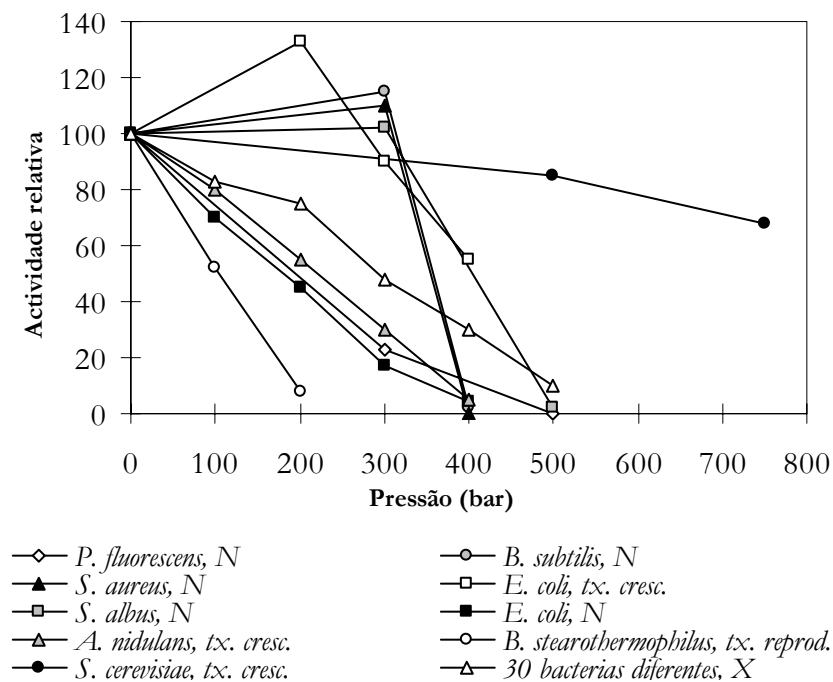


Figura 2.6 Efeito da pressão total na actividade microbiana relativamente à actividade observada à pressão atmosférica. A actividade é analisada pela densidade de células expressa em número de células por mililitro (N) e concentração mássica de células (X), ou pelas taxas de crescimento (tx. cresc.) e reprodução (tx. reprod.) (Onken e Liefke, 1989).

É também visível que, para pressões superiores a 300 bar, existe uma tendência geral para a inibição do crescimento, embora haja outros microrganismos a contrariar esta tendência, como é o caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta última, apresenta ainda valores elevados de actividade para pressões superiores a 700 bar.

De salientar a existência de alguma discrepância nos resultados apresentados para o mesmo microrganismo por diferentes autores. De facto, como se pode

observar na Figura 2.6, estão apresentadas duas curvas distintas de inactivação pela pressão para a bactéria *E. coli*.

2.3.2.1.1 Espécies barotolerantes e barófilas

Em 1957, ZoBell e Morita foram os primeiros investigadores a conseguir isolar, do fundo do mar, microrganismos especificamente adaptados a pressões muito altas e designaram-nos por bactérias barófilas. A pressão óptima para o crescimento deste tipo de microrganismos é de 500 bar a 700 bar a 10 °C, enquanto que para as espécies barotolerantes se situa entre 1 bar a 300 bar.

As espécies de microrganismos barotolerantes que vivem à pressão atmosférica no seu habitat natural, mostram possuir resistência suficiente para sobreviver e eventualmente crescer a pressões de 400 bar a 500 bar. Contrastando com este tipo de microrganismos, os barófilos isolados das profundezas dos oceanos (aproximadamente 10.000 m de profundidade) necessitam de pressões altas, de cerca 1000 bar, para o seu crescimento. Segundo Kato e Horikoshi (1996), este tipo de microrganismos apresenta um grande potencial de aplicabilidade biotecnológica, uma vez que as proteínas e os genes deste tipo de bactérias estão adaptados a elevados valores de pressões podendo, desta forma, ser utilizados no desenvolvimento e optimização de novos bioprocessos.

O efeito da pressão sobre o crescimento e o metabolismo dos microrganismos está também dependente dos métodos e sistemas de pressurização utilizados. A pressão pode ser aplicada hidrostáticamente (compressão de um líquido) e hiperbaricamente (compressão de gases). Vários investigadores têm utilizado reactores hiperbáricos para simular, em laboratório, ambientes de alta pressão (Taylor, 1979; Sturn *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 1991). Nelson *et al.* (1992) demonstraram que os efeitos da pressão hidrostática e hiperbárica sobre o crescimento de uma bactéria marinha são consideravelmente diferentes.

2.3.2.1.2 Aplicações industriais da alta pressão

A potencial aplicação da alta pressão em processos biológicos remonta ao século XIX. A aplicação da alta pressão para eliminar bactérias foi descrita inicialmente por Royer, em 1895. Em 1899, Hite e os seus colaboradores, descreveram o uso da alta pressão na preservação do leite, tentando aplicá-la também na preservação de frutos e vegetais (Marquis, 1994). Posteriormente, em 1914, Bridgman observou a coagulação da clara do ovo por tratamento a alta pressão (Hayashi, 1996). Estes trabalhos impulsionaram a investigação da alta pressão em materiais biológicos e em microrganismos, e os progressos têm sido contínuos até aos dias de hoje.

A utilização da pressão em biotecnologia é cada vez mais vasta, conforme concluído em 1996, na conferência de Biociências e Biotecnologia a Alta Pressão, que decorreu no Japão (Hayashi, 1996). Em 1992, uma companhia Japonesa, Meidiya Food Company, lançou no mercado vários produtos processados através da alta pressão, como por exemplo geleias de frutos, compotas e molhos. Estes produtos têm sabores naturais muito fortes e cores bastante vivas, o que é encarado como um exemplo de sucesso do processamento de alimentos através da alta pressão (Marquis, 1994; Hayashi, 1996).

De facto, a cada vez maior exigência do consumidor em relação a produtos alimentares livres de aditivos e estáveis durante um período de prateleira mais prolongado, levou à procura de processos alternativos aos tradicionais tratamentos por aquecimento. Este tipo de processo alternativo inclui o tratamento através da alta pressão (3000 bar a 10000 bar), que causa a inactivação dos microrganismos e da actividade enzimática, deixando inalteradas vitaminas e pequenas moléculas responsáveis pelo sabor, aroma e cor dos alimentos. Por outro lado, a pressão pode estimular muitas reacções químicas, como por exemplo, a libertação de alguns aromas de células vegetais (Smelt, 1998).

A utilização da alta pressão estende-se além da biotecnologia e tem sido desenvolvida também na área da medicina. Ao contrário da temperatura, a pressão, ao manter as características dos alimentos, como sejam o sabor, a cor e os seus nutrientes naturais, pode ter potencialidades únicas de aplicação em materiais biológicos, como por exemplo, tecidos e órgãos (Hayashi, 1996).

A tecnologia de alta pressão é muito útil na extracção de produtos bioquímicos intracelulares, sendo utilizada nos processos de ruptura celular, de que são exemplos a homogeneização a alta pressão (Hetherington *et al.*, 1971) e a utilização de descargas abruptas de dióxido de carbono (Nakamura *et al.*, 1994).

Na gama mais baixa da alta pressão, esta tem ainda grandes potencialidades nos processos fermentativos (Thibault *et al.*, 1987) ou na manutenção selectiva de estirpes geneticamente manipuladas (Marquis, 1994).

A alta pressão é também aplicada em muitos processos de separação de bioproductos como é o caso da extracção supercrítica. L'Italien *et al.* (1989) têm estudado a extracção, a alta pressão, com dióxido de carbono supercrítico, para recuperar *in situ* o etanol produzido durante o processo fermentativo, impedindo que o etanol se torne inibidor do crescimento, mantendo a produtividade elevada.

2.3.2.2 Pressão moderada

Quando os processos biotecnológicos em foco se situam na área da tecnologia das fermentações, é claro que os efeitos da alta pressão não são relevantes nos processos aeróbios, uma vez que, os biorreactores industriais operam à pressão atmosférica ou ligeiramente sobre pressão, podendo, no entanto, suportar valores de pressão de 3 a 4 vezes o valor de operação (margem de segurança). É sabido que a actividade microbiana é afectada por oscilação de pressão, ainda que ligeira (Onken e Liefke, 1989).

Na Tabela 2.7, encontram-se alguns resultados obtidos a partir de investigações realizadas sobre o efeito da pressão moderada em diversos microrganismos.

Tabela 2.7 O efeito da pressão total moderada em culturas microbianas aeróbias

Microrganismo	Pressão total (bar)	Efeito	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 - 30	Inibição do crescimento celular	Hedén e Malmberg, 1961
<i>Escherichia coli</i>	1 - 60	Inibição do crescimento celular	Hedén e Malmberg, 1961
<i>Candida utilis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10.0	Inibição do crescimento celular	Gifford e Pritchard, 1969
<i>Candida utilis</i>	1 - 7	Diminuição do rendimento em biomassa; não afectou o $\mu_{\text{máx}}$	Onken <i>et al.</i> , 1984
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 - 8	Inibição do crescimento celular (sem crescimento P=8 bar)	Onken e Jostmann, 1984
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 - 6	Diminuição do rendimento em biomassa; diminuição do $\mu_{\text{máx}}$	Kataoka <i>et al.</i> , 1986
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7.0	Inibição da produção de etanol	Thibault <i>et al.</i> , 1987
<i>Candida tropicalis</i>	8.1	Aumento do rendimento em ácido cítrico	Okoshi <i>et al.</i> , 1987
<i>Escherichia coli</i> TB1	4.8	Aumento da produtividade de proteína recombinante em cultura semi-contínua	Belo e Mota, 1998
<i>Thermus</i> sp. RQ-1	5.6	Aumento da produtividade em biomassa	Belo <i>et al.</i> , 2000

O efeito da pressão no comportamento metabólico dos microrganismos não é facilmente explicável, uma vez que o comportamento encontrado pode não ser um resultado directo da pressão total, mas sim das pressões parciais dos componentes gasosos envolvidos no processo. Em processos aeróbios, numa análise mais detalhada e criteriosa, deve entrar-se em linha de conta com o efeito

das pressões parciais de oxigénio e de dióxido de carbono. Para além das pressões parciais destes gases, deve ter-se ainda em atenção que nos reactores industriais de grandes dimensões, e especialmente os que têm altura elevada, os microrganismos estão sujeitos a gradientes de pressão, existentes devido à pressão hidrostática exercida pelo líquido. Estas diferenças da pressão total afectam directamente a concentração dos gases dissolvidos. A situação complica-se no que concerne ao oxigénio, também porque há a possibilidade de uma mistura deficiente do meio de cultura (Onken e Liefke, 1989).

2.3.3 Efeito da pressão parcial de dióxido de carbono

2.3.3.1 A concentração de dióxido de carbono

O dióxido de carbono é um componente importante no metabolismo dos microrganismos aeróbios, quer como produto das reacções de descarboxilação, quer como substrato nas reacções de carboxilação necessárias à formação de intermediários importantes das vias metabólicas. O dióxido de carbono produzido através das reacções de descarboxilação, como por exemplo, na respiração dos compostos orgânicos, dissolve-se no meio, de onde será libertado através da corrente de entrada de ar para o meio de cultura. Por outro lado, o dióxido de carbono é necessário para a produção de intermediários metabólicos, como é o caso do oxaloacetato que pode ser produzido através da carboxilação do piruvato. Desta forma, embora parte do dióxido de carbono possa ser consumido através da cadeia respiratória, o balanço global do crescimento aeróbio será direccionado no sentido de existir sempre dióxido de carbono em excesso. Em consequência disso, o meio de cultura estará saturado de dióxido de carbono, dependendo da quantidade que é libertada na corrente gasosa (Onken e Liefke, 1989).

A concentração de dióxido de carbono dissolvido em meios aquosos em equilíbrio com o ar, à pressão atmosférica e a 25 °C, é bastante baixa (cerca de

$10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) quando comparada com o respectivo valor para o oxigénio (cerca de $26.3 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Onken e Liefke, 1989). Isto deve-se à diferença dos valores das pressões parciais destes dois componentes no ar, sendo $3 \times 10^{-4} \text{ bar}$ e $21 \times 10^{-1} \text{ bar}$, para o dióxido de carbono e oxigénio, respectivamente. É de referir que o dióxido de carbono é um gás muito mais solúvel em água do que o oxigénio (cerca de 2.5 vezes mais) e que o valor de pressão parcial de dióxido de carbono (p_{CO_2}), $3 \times 10^{-4} \text{ bar}$, pode ser largamente excedido em culturas microbianas, quando os processos respiratórios ou fermentativos produzem dióxido de carbono *in situ*.

Em meios aquosos fracamente tamponados, os efeitos do dióxido de carbono no metabolismo podem ser ainda uma consequência indirecta da alteração de pH, devido à formação de hidrogeno-carbonato e de carbonato, pelas reacções de associação e dissociação evidenciadas pelas equações 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4.



A velocidade da reacção de formação de ácido carbónico é bastante lenta quando comparada com a sua dissociação. Uma indicação da importância relativa de cada uma das formas moleculares de dióxido de carbono, na fase líquida de uma fermentação, é dada pelas seguintes relações de equilíbrio:

$\frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_2]} = 10^{-3} \quad (2.5)$

$$\frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = \frac{2.5 \times 10^{-4}}{[H^+]} \quad (2.6)$$

$$\frac{[CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-]} = \frac{5.6 \times 10^{-11}}{[H^+]} \quad (2.7)$$

De acordo com as constantes de equilíbrio das reacções das equações 2.6 e 2.7 em água a 25°C, $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $5.6 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente, torna-se evidente, que a concentração do ião carbonato é sempre desprezável para a gama de valores normalmente utilizada em processos de fermentação ($\text{pH} < 5.5$) (Onken e Liefke, 1989). Em fermentações com leveduras ($\text{pH} 4.0 - 5.5$) o dióxido de carbono dissolvido encontrar-se-à, maioritariamente na forma de $\text{CO}_2(\text{aq.})$. Para esta gama de pH podem ignorar-se as reacções de dióxido de carbono dissolvido com os iões hidroxilo (Ferreira e Teixeira, 2003). No entanto, para valores de pH entre 7.0 e 9.0 predomina o ião HCO_3^- , e para pH superior a 11 é o CO_3^{2-} a espécie dominante.

2.3.3.2 Efeito do dióxido de carbono no crescimento microbiano

É sabido que o dióxido de carbono, em concentrações muito altas, inibe o crescimento microbiano. Este facto é utilizado na preservação de alimentos embalados, como por exemplo, na carne e nas bebidas. Contudo, a influência da pressão parcial do dióxido de carbono no crescimento aeróbio não é uniforme para todos os microrganismos. De facto, na maioria dos trabalhos de investigação realizados, o crescimento microbiano é inibido com o aumento da pressão parcial de CO_2 (p_{CO_2}). Gill e Tan (1979) comprovaram, contudo, que o crescimento de *Pseudomonas fluorescens* em meio mínimo era estimulado por uma pressão parcial de CO_2 de 0.133 bar, sendo de seguida inibido por valores superiores. Da mesma forma, Ho e Smith (1986) relataram que a produção de penicilina e o crescimento

do micélio eram inibidos apenas para pressões parciais de CO₂ superiores a 0.126 bar. Sigler e Höfer (1991) notaram que havia inibição de diversas enzimas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando a pressão parcial de CO₂ era superior a 0.5 bar. Na indústria de produção de fermento de padeiro, o aumento da pressão, devido aos elevados níveis de CO₂ que se formam durante o processo fermentativo, pode causar danos irreparáveis nas células de levedura, principalmente se se combinar este efeito com o efeito do etanol (Jones e Greenfield, 1982).

Convém no entanto, salientar que, nos processos aeróbios, o CO₂ metabolicamente produzido contribui com uma composição no gás dentro do reactor que está compreendida entre 1 % e 3 % (v/v), o que corresponde a uma pressão parcial máxima de 0.03 bar à pressão atmosférica. Este valor é suficientemente baixo, possibilitando assim a utilização de pressões de ar moderadas na cultura aeróbia de células, mantendo p_{CO_2} inferior aos valores a partir dos quais se registam efeitos inibidores para a maior parte dos microrganismos. No entanto, este mesmo efeito não poderá ser negligenciado em processos industriais (Onken e Liefke, 1989).

2.3.4 Efeito da pressão parcial de oxigénio

2.3.4.1 A concentração de oxigénio dissolvido

Tal como referido em sub-capítulos anteriores, o oxigénio molecular é um nutriente necessário aos microrganismos aeróbios. Isto porque, para além de ser um substrato para as enzimas do metabolismo respiratório, o oxigénio é também necessário para a biossíntese de esteróis e ácidos gordos não saturados (Walker, 1998). O oxigénio deve ser então considerado como um factor indispensável ao crescimento. A taxa de crescimento dos microrganismos depende da concentração de oxigénio no meio, o qual exerce um papel determinante na actividade celular através da produção de energia nos processos respiratórios.

Todavia, devido à sua baixa solubilidade, a concentração de oxigénio dissolvido no meio está limitada a valores também baixos, $0.263 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (25°C , 1 bar) (Onken e Liefke, 1989). Tal como o CO_2 , a concentração de oxigénio dissolvido diminui na presença de soluções de electrólitos e de compostos orgânicos. De forma a exemplificar as consequências da baixa solubilidade do oxigénio no crescimento aeróbio microbiano, considere-se o seguinte exemplo:

Durante um processo fermentativo, uma dada estirpe de levedura apresenta uma taxa específica de crescimento de 0.5 h^{-1} e uma taxa de consumo de O_2 de 1.5 g g^{-1} . Nas condições operacionais de temperatura, 30°C , 100 % de saturação, a 1 bar de pressão total de ar, o meio contém 7.5 mg L^{-1} de oxigénio. Se a concentração de biomassa for de 10 g L^{-1} , o oxigénio disponível no meio seria totalmente consumido em 3.6 s, isto, no caso de cessar o arejamento.

Onken e Liefke, 1989

Este exemplo demonstra claramente a importância que uma eficiente transferência de oxigénio no meio de cultura tem, no crescimento microbiano.

Têm sido propostas várias formas de promover uma eficiente transferência de massa (Tabela 2.8) e aumentar deste modo, a concentração de oxigénio dissolvido no meio. Destacam-se, por exemplo, a utilização de ar enriquecido com oxigénio ou oxigénio puro, ou a pressurização do biorreactor. A taxa à qual o oxigénio é consumido pelas células determina a taxa à qual o oxigénio deve ser transferido do gás para o líquido (Doran, 1995).

Cada um dos métodos referidos na Tabela 2.8 apresenta limitações de aplicação, quer derivadas do aumento de custos nos processos de separação a jusante do biorreactor, quer de biocompatibilidade e toxicidade dos produtos adicionados à cultura (Yang e Wang, 1992).

Tabela 2.8 Métodos propostos para melhorar a taxa de transferência de oxigénio em bioprocessos

Método	Referências
Produção intracelular de oxigénio pela catalase das células. Adição ao meio de peróxido de hidrogénio.	Ibrahim e Schelegel, 1980
Aumento da solubilidade de oxigénio pela adição ao meio de hidrocarbonetos e fluorcarbonetos que formam uma fase orgânica rica em O ₂ .	Cho e Wang, 1988
Imobilização de culturas mistas com algas fotossintéticas produtoras de oxigénio.	Khang <i>et al.</i> , 1988
Utilização de transportadores de oxigénio. Adição ao meio de óleo de silicone microencapsulado.	Ju e Armiger, 1992
Geração in situ de oxigénio pela adição de peróxido de hidrogénio e catalase	Leung <i>et al.</i> , 1997

São vários os factores que podem influenciar as necessidades totais de oxigénio num dado processo biológico, sendo de destacar a espécie microbiana envolvida no processo, a fase de crescimento em que se encontre, e a natureza da fonte de carbono, entre outros (Doran, 1995; Stanbury e Whitaker, 1984).

A concentração de oxigénio dissolvido pode ser obtida em função da pressão parcial de oxigénio, de acordo com a equação:

$$p_{O_2} = P y_{O_2} \quad (2.8)$$

Em que,

p_{O_2} é a pressão parcial de oxigénio.

P é a pressão total.

y_{O_2} é a fracção molar do oxigénio na mistura gasosa.

O valor da concentração de oxigénio na saturação é afectado significativamente pela pressão total de ar e, consequentemente pela pressão

parcial de oxigénio. A relação de equilíbrio entre estes dois parâmetros é dada pela lei de Henry traduzida por:

$$p_{O_2} = H_{O_2} C_{O_2}^* \quad (2.9)$$

Em que,

p_{O_2} é a pressão parcial de oxigénio.

H_{O_2} é a constante de Henry, que é função da temperatura.

$C_{O_2}^*$ é a solubilidade do oxigénio no líquido.

2.3.4.1.1 Transferência de oxigénio

Um dos factores que mais influencia a produção em biomassa é a concentração de oxigénio dissolvido no meio, disponível para utilização pelas células.

A equação de balanço material ao oxigénio dissolvido traduz-se, de um modo geral, pela equação seguinte:

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR - DC_L \quad (2.10)$$

Em que,

C_L é a concentração de oxigénio dissolvido no meio.

t é o tempo.

OTR é a taxa de transferência de oxigénio.

OUR é a taxa de consumo de oxigénio.

D é a taxa de diluição.

Para que a concentração de oxigénio dissolvido no meio se mantenha acima do valor crítico para uma dada estirpe, podendo este ser definido como o valor abaixo do qual a difusão do oxigénio passa a ser o passo limitante de crescimento (Blanch e Moo-Young, 1987), a taxa de transferência de oxigénio (OTR) deve ser

igual ou superior, à taxa de consumo de oxigénio pelas células (OUR). Esta última depende da densidade celular (X) e da taxa específica de consumo de oxigénio (q_{O_2}) conforme indicado na equação 2.11:

$$OUR = q_{O_2} X \quad (2.11)$$

Shuler e Kargi (1992) sugerem valores de q_{O_2} na ordem dos 40 mmol·L⁻¹·h⁻¹ a 200 mmol·L⁻¹·h⁻¹ para os sistemas à escala industrial, e 40 mmol·L⁻¹·h⁻¹ a 60 mmol·L⁻¹·h⁻¹ nos restantes sistemas. A taxa de transferência de oxigénio depende das características do reactor e das condições de operação, podendo ser calculada através da seguinte equação:

$$OTR = k_{L,a} (C^* - C_L) \quad (2.12)$$

Em que,

C^* é a concentração de saturação de oxigénio dissolvido.
 $k_{L,a}$ é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio.

Nos fermentadores convencionais e sob elevada agitação e arejamento, a taxa de transferência de oxigénio pode variar entre 240 mmol·L⁻¹·h⁻¹ a 480 mmol·L⁻¹·h⁻¹. Dada a baixa solubilidade do oxigénio nos meios (7.7 mg·L⁻¹ a 30 °C em água), torna-se bastante difícil de aumentar a taxa de transferência de oxigénio neste tipo de fermentadores. O aumento de OTR e, consequentemente da produtividade em biomassa, requer a construção de novos fermentadores (Hensirisak, 1997) ou o aumento da pressão parcial de oxigénio no fermentador (com pressão de oxigénio puro ou aumentando a pressão de ar) (Matsumura *et al.*, 1982; Belo *et al.*, 2000).

2.3.4.1.2 O coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio

A capacidade de transferência de oxigénio num sistema de agitação pode ser avaliado através da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio, k_{La} . O valor de k_{La} é influenciado por um número elevado de factores, como a geometria do reactor, as condições operacionais de arejamento (velocidade de agitação e caudal de arejamento), as características reológicas do meio (densidade e viscosidade) e as variáveis ambientais (temperatura e pressão) (Doran, 1995). Têm sido propostas inúmeras equações para a determinação deste parâmetro, relacionando o tamanho das bolhas de gás, a velocidade do líquido, a densidade, a viscosidade e a difusividade do oxigénio (Tabela 2.9).

Tabela 2.9 Correlações para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa de acordo com o sistema com o qual foram obtidas e respectivas referências bibliográficas

Referência	Tipo de sistema	Equação	Unid.	Eq.
van't Riet, 1979	Água com iões/ar à pressão atmosférica	$k_{La} = 2.6 \times 10^{-3} \left(\frac{P_o}{V} \right)^{0.4} u_G^{0.5}$	(s ⁻¹)	(2.13)
Wang <i>et al.</i> , 1979	Cultura de fungos/ar à pressão atmosférica	$k_{La} = 8.42 \left(\frac{P_o}{V} \right)^{0.33} u_G^{0.56}$ P_o/V , hp/1000 L u_G , cm·min ⁻¹	(h ⁻¹)	(2.14)
Montes <i>et al.</i> , 1999	Cultura de <i>Trignopsis variabilis</i> /ar à pressão atmosférica	$k_{La} = 3.2 \times 10^{-3} \left(\frac{P_o}{V} \right)^{0.35} u_G^{0.41}$	(s ⁻¹)	(2.15)
Sato <i>et al.</i> , 1981	Água/ar pressurizado até 5.9 bar	$k_{La} = 2.8 \times 10^{-8} (P^{0.1}) (u_G^{0.35}) (P_o^{1.8})$	(s ⁻¹)	(2.16)

Em que,

k_{La} é o coeficiente de transferência de oxigénio, s⁻¹ ou h⁻¹

P_o é a potência dissipada pelo agitador, W.

V é o volume do líquido, m³.

u_G é a velocidade superficial do gás, m·s⁻¹.

P é a pressão total de ar, bar.

Teoricamente estas correlações permitem prever os coeficientes de transferência de massa com base em diversas experiências realizadas. No entanto, na prática, a exactidão destas correlações quando aplicadas a culturas biológicas é extremamente fraca. Isto, porque a transferência de massa é significativamente influenciada pelos diversos componentes presentes no meio de cultura (substrato, sais, células, etc.) e a maior parte das correlações publicadas foram obtidas a partir de experiências em sistemas com água e ar (Doran, 1995).

A correlação mais frequentemente utilizada em sistemas fermentativos, em reactores agitados, é a equação 2.13, a qual relaciona o k_{La} com a velocidade do gás e a potência do agitador.

A equação 2.13 é válida para líquidos coalescentes e newtonianos, para volumes de reactores inferiores a 2600 L e para valores de $\left(\frac{P_o}{V}\right)$ compreendidos entre $500 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ e $10.000 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ (Doran, 1995; Schell *et al.*, 2001). Esta equação não considera os líquidos não-newtonianos, como é o caso da grande parte dos meios de cultura e de culturas de elevada densidade celular, nem considera o efeito dos açúcares, do agente anti-espuma e da presença de sais.

Este tipo de correlação (com outras constantes) foi sugerida por Wang *et al.* (1979) (Eq. 2.14) para um meio de cultura não-newtoniano (cultura de fungos) com volumes de reactores de 20 L a 30.000 L. Têm sido propostas outras correlações para outros tipos de meios de cultura, com o objectivo de obter uma aproximação mais precisa de k_{La} . A equação 2.15, por exemplo, foi obtida num meio de cultura de *Trigonopsis variaabilis* num fermentador agitado e arejado, que tinha um comportamento tipicamente newtoniano e o meio de cultura tinha um comportamento levemente não-coalescente, devido à presença de uma concentração moderada de sais minerais. Todas as equações da Tabela 2.9 sugerem que o valor de k_{La} aumenta se se aumentar a velocidade superficial do gás no reactor. No entanto, o expoente é inferior à unidade, o que quer dizer que

o efeito do gás não é o mais significativo. Como o expoente de P_o também é inferior à unidade, o aumento de k_{LA} através do aumento de P_o ou do caudal volumétrico de ar torna-se progressivamente menos eficiente e tem o acréscimo de custos para o processo produtivo (Doran, 1995). Tal como mencionado no ponto 2.3.4.1, uma outra forma de aumentar a transferência de oxigénio no meio, é através do aumento da pressão de ar ou oxigénio (Sumino *et al.*, 1992). Com base neste facto, Sato *et al.* (1981) sugeriram uma outra correlação para o k_{LA} , na qual incluíram a pressão total (P), esta correlação é representada pela equação 2.16.

Embora o k_{LA} seja um parâmetro difícil de prever, é no entanto um parâmetro mensurável e existem diversas formas de o determinar. Os métodos tradicionais mais utilizados dividem-se em dois tipos, com base no estado em que são realizados: estado transiente e estado estacionário. Estes métodos são descritos no capítulo 3.3.

2.3.4.2 Efeito do oxigénio nas culturas microbianas

2.3.4.2.1 No crescimento

Tal como qualquer outro substrato, o oxigénio pode ser um factor limitante do crescimento de culturas microbianas aeróbias, quando a sua concentração no meio decresce abaixo do valor crítico. Esta concentração crítica depende, não só da estirpe do microrganismo, mas também das condições e do estado da cultura (Doran, 1995). Normalmente este valor está compreendido entre 0.1 % a 20 % da saturação, à pressão atmosférica, aproximadamente $0.008 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Onken e Liefke, 1989).

O efeito da pressão parcial de oxigénio (p_{O_2}) no comportamento fisiológico de microrganismos tem sido alvo de vários estudos. De acordo com a Figura 2.7, verifica-se que as várias culturas estudadas não se comportam do mesmo modo perante o aumento da pressão parcial de oxigénio. Por exemplo, a estirpe

Pseudomonas aeruginosa apresenta um decréscimo de apenas 18 % de actividade relativa quando a pressão parcial de oxigénio aumenta de 0.2 bar para 1.5 bar, enquanto que, a actividade relativa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta um decréscimo de cerca de 60 %, com um aumento da pressão parcial de oxigénio de apenas 0.4 bar. Convém salientar que o facto das condições operacionais serem diferentes, como por exemplo, a composição do meio e o tipo de substrato, pode determinar as diferenças nos efeitos observados. Ainda assim, embora o comportamento dos vários microrganismos seja diferente, verifica-se uma tendência geral para a inibição do crescimento celular. A diferença reside no valor da pressão parcial de oxigénio máxima que o microrganismo consegue tolerar.

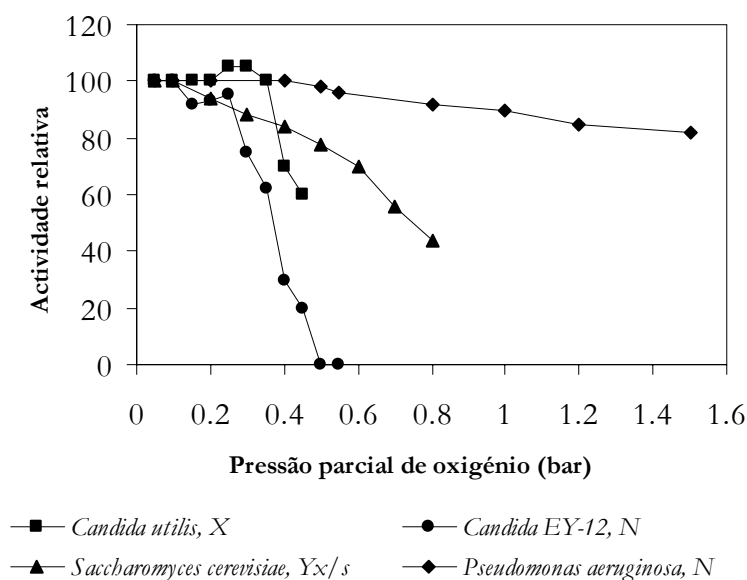


Figura 2.7 Efeito da pressão parcial de oxigénio na actividade celular de várias estirpes relativamente à pressão atmosférica, *i.e.*, $p_{O_2}=210$ mbar. A actividade é analisada pela densidade de células expressa em número de células por mililitro (N) e concentração mássica de células (X) ou pelo rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$) (Onken e Liefke, 1989).

É também interessante observar que espécies do mesmo género (*Pseudomonas*) apresentam comportamentos diferentes com o aumento da p_{O_2} (Tabela 2.10): o crescimento da bactéria *Pseudomonas fluorescens* foi totalmente inibido a uma pressão parcial de oxigénio de 1.68 bar (correspondente a 8 bar pressão total de

ar), enquanto que com *Pseudomonas aeruginosa*, apenas se verificou um decréscimo de 60 % no seu crescimento, com uma pressão parcial de oxigénio de 1.5 bar (correspondente a uma pressão total de ar de 7 bar). Isto revela que *Pseudomonas fluorescens* é uma espécie mais sensível ao oxigénio do que *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 2.10 Efeito da pressão parcial de oxigénio no crescimento de culturas aeróbias

Microrganismo	$p_{O_2}^{\text{máx}}$ (bar)	Efeito	Modo operacional	Referência
Fermento de padeiro	0.81	60 % de diminuição no rendimento em biomassa	Contínuo	Hartmeier <i>et al.</i> , 1971
<i>Candida utilis</i>	0.41	Máximo rendimento em biomassa atingido com $p_{O_2}=0.35$ bar	Contínuo	Páca e Grégr, 1979
<i>Candida</i> EY-12	1.00	Inibição total do crescimento com $p_{O_2}=0.5$ bar	Descontínuo	Matsumura <i>et al.</i> , 1980
<i>Candida brassicae</i>	2.00	Aumento da produtividade em biomassa de $10 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ($P_{ar}=1\text{bar}$) para $20 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ($p_{O_2}=2\text{bar}$)	Semi-contínuo	Matsumura <i>et al.</i> , 1982
<i>Candida utilis</i>	1.47	Diminuição do rendimento em biomassa e aumento da formação de CO_2	Contínuo	Onken <i>et al.</i> , 1984
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.50	60 % de diminuição no rendimento em biomassa	Descontínuo	Sato <i>et al.</i> , 1984
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.00	25 % a 40 % de diminuição na concentração celular, dependendo da D	Contínuo	Lee e Hassan, 1987
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.68	Inibição total do crescimento com $p_{O_2}=1.68$ bar; aumento da taxa específica de crescimento com $p_{O_2}=0.92$ bar	Descontínuo	Onken, 1990
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.00	Inibição total do crescimento	Descontínuo	Pinheiro <i>et al.</i> , 1997

Outros estudos permitiram observar diferenças do mesmo género com outros microrganismos (Tabela 2.10). A espécie *Candida brassicae* conseguiu tolerar uma pressão total de oxigénio bastante elevada, 2 bar, quando comparada com *Candida utilis* (Onken *et al.*, 1984). Esta última apresenta um decréscimo do rendimento em biomassa com 1.47 bar de pressão parcial de oxigénio. É de

referir que estes ensaios foram realizados em semi-contínuo e em contínuo, respectivamente.

2.3.4.2.2 Na formação de produtos

É de grande interesse industrial maximizar a produtividade, assim como a taxa de formação de produto. Devido a este facto, torna-se imperativo estudar qual o efeito da pressão de gases na produtividade de algumas espécies, nomeadamente as de interesse industrial.

Por exemplo, no caso da produção ácido cítrico a partir de culturas de *Aspergillus niger* a operar em descontínuo, em culturas ricas em melaço, Clark e Lentz (1961) observaram que, com uma pressão parcial de oxigénio 1.7 bar, era possível aumentar a produtividade máxima deste ácido. Neste trabalho, a limitação de oxigénio era bastante acentuada. Belo *et al.* (2000) obtiveram um aumento de produtividade da estirpe termófila de *Thermus* sp. RQ-1 quando usaram ar hiperbárico a 5.6 bar, num biorreactor de pressão.

Outro exemplo da utilização da pressão é o aumento de um constituinte celular. No trabalho realizado por Young (1969) com células de bactéria de *Pseudomonas saccharophila*, o aumento da pressão de oxigénio puro até 1 bar aumentou o conteúdo em polissacáridos das células desta bactéria.

A utilização da pressão de gases pode também ser aplicada na optimização da produção de proteína recombinante. Belo e Mota (1998) demonstraram que a utilização de ar hiperbárico até 4.8 bar permitiu um aumento de cerca de 4 vezes na produtividade em citocromo b5, relativamente à cultura realizada à pressão atmosférica, em culturas em descontínuo de *Escherichia coli* TB1.

A partir destes resultados, é bastante claro que o aumento da pressão parcial de oxigénio tem efeitos bastante distintos. Os efeitos positivos da pressão podem estar directamente relacionados com o melhoramento da taxa de transferência de oxigénio, ou podem ser estar de alguma forma relacionados com a indução do

metabolismo celular, enquanto os efeitos negativos estão apenas relacionados com mecanismos metabólicos (Onken e Liefke, 1989).

2.3.4.2.3 A toxicidade do oxigénio

Na evolução da vida na terra, os processos metabólicos aneróbios desenvolveram-se numa atmosfera praticamente sem oxigénio e os organismos aeróbios apareceram só quando o oxigénio, gerado por fotossíntese, surgiu (Onken e Liefke, 1989). Esta evolução desencadeou o desenvolvimento de mecanismos complexos para a utilização do oxigénio (oxigénio como aceitador terminal de electrões na cadeia respiratória) mas, simultaneamente, causou o desenvolvimento de uma série de mecanismos que protegem as células das espécies reactivas de oxigénio (ERO) (Gille e Sigler, 1995).

O oxigénio desempenha um papel regulatório em muitos processos metabólicos, mas os mecanismos específicos envolvidos não podem ser compreendidos antes das reacções metabólicas e fisiológicas o serem completamente, tendo em consideração os processos a partir dos quais se liberta oxigénio e as reacções que desencadeiam a formação das ERO (Miquel, 1989). Deve-se notar que o oxigénio molecular tem uma reactividade baixa e a sua toxicidade advém grandemente do seu estado excitado (singleto) ou das suas formas de radical semi-reduzido, o que pode desencadear processos oxidativos letais às células (Gille e Sigler, 1995).

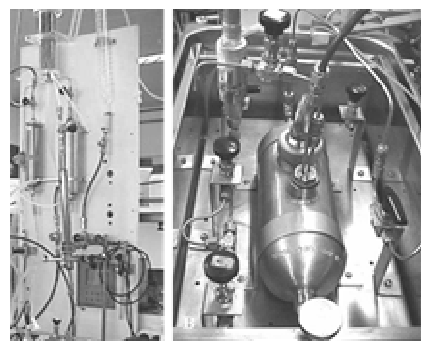
Os fenómenos que explicam toxicidade do oxigénio serão discutidos com maior profundidade no capítulo 6 (Resposta da levedura *Kluyveromyces marxianus* ao stresse oxidativo).

Capítulo 3

Materiais e Métodos Gerais

“Best information and technology from biological and chemical engineering accomplishes new syntheses for bioprocess design, operation, analysis and optimization. Reaching this objective clearly requires years of careful study and practice.”

Bailey e Ollis, 1986



Capítulo 3

Materiais e Métodos Gerais

Sumário

Neste capítulo são descritas as metodologias e os equipamentos utilizados no cultivo de microrganismos em condições hiperbáricas e em condições de pressão normal.

Foram utilizados três biorreactores hiperbáricos e um biorreactor à pressão atmosférica. Também se realizaram ensaios com micro-arejamento, em matraz.

São ainda descritos os métodos analíticos e instrumentais aplicados na execução laboratorial deste trabalho e que foram comuns ao estudo das três estirpes estudadas.

3.1 Biorreactores hiperbáricos	64
3.2 Ensaio à pressão atmosférica	73
3.3 Determinação da capacidade de transferência de oxigénio	76
3.4 Determinação dos rendimentos, produtividade e taxas específicas de crescimento	83
3.5 Métodos microscópicos e análise de imagem	85
3.6 Métodos analíticos	93

3.1 Biorreactores hiperbáricos

Os ensaios efectuados com pressão absoluta superior à atmosférica foram realizados em três instalações experimentais diferentes. Cada uma destas instalações será descrita em pormenor e por ordem cronológica nos seguintes sub-capítulos.

3.1.1 Biorreactor Whitey de 0.3 L

3.1.1.1 Características do equipamento

O biorreactor, que permite operar até uma pressão de 150 bar, consiste num cilindro (modelo 304L-HDF4-300cc da Whitey) construído em aço inox 304, com um volume útil de 300 mL. A temperatura é controlada por meio de um banho termostatzado (Certomat®WR-B.Braun) onde o biorreactor se encontra imerso (Figura 3.1 e Figura 3.2). O banho possui agitação horizontal permitindo também a agitação do biorreactor, o qual se encontra instalado no tabuleiro móvel do banho.

A pressão no interior do reactor é fixada manualmente ajustando a pressão a montante do reactor e a abertura das válvulas V1 (válvula de tudo/nada - Whitey modelo SS-41S2) e V2 (válvula de regulação - Whitey modelo SS-ORS2) e ainda através da regulação das válvulas à saída V4 (válvula de regulação - Whitey modelo SS-ORS2) e V5 (válvula de agulha - Whitey modelo SS-SS2). A monitorização da pressão dentro do reactor é efectuada através de um transdutor de pressão (modelo HD 9220, Delta OHM), permitindo assim a leitura digital dos valores de pressão absoluta. O sistema de pressurização incorpora ainda um filtro de ar de 0.45 μm de porosidade em aço inox (modelo SS-2TF-LE) e uma válvula anti-retorno. Estas peças de equipamento estão colocadas na tubagem de entrada do gás, a qual pode estar ligada ao posto de ar comprimido, que debita

um máximo de pressão de 7 bar, ou a garrafas de ar comprimido ou de oxigénio puro.

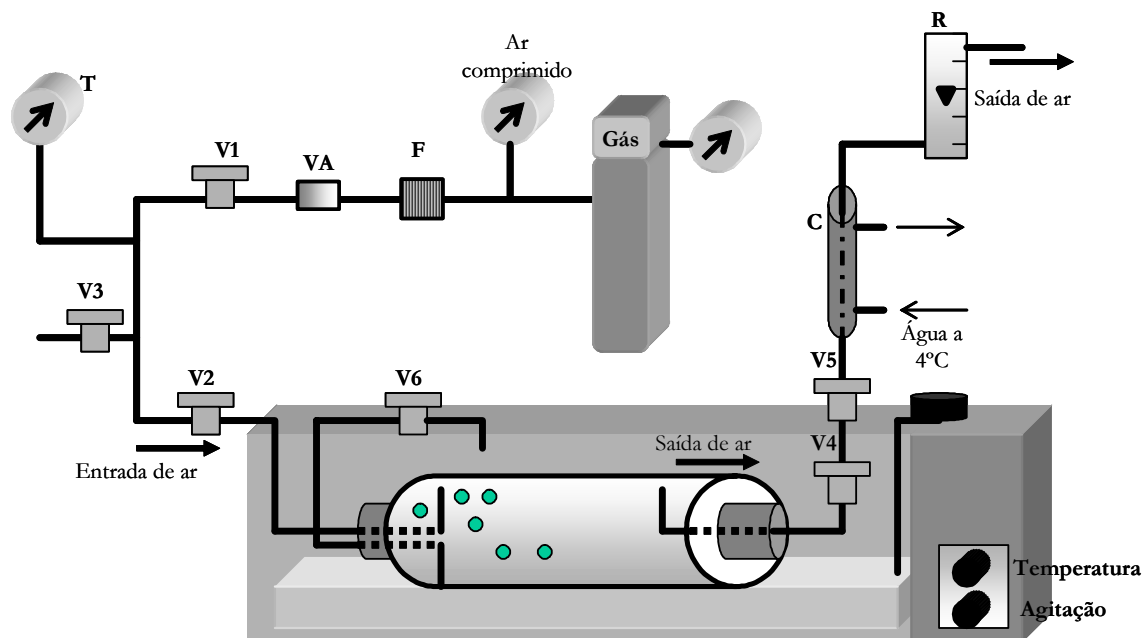


Figura 3.1 Esquema da instalação experimental – biorreator Whitey de 0.3 L e acessórios: C – condensador, F – filtro de ar, R – rotâmetro de ar, VA – válvula anti-retorno, V1, V3 e V6 – válvulas tudo ou nada, V2 e V4 – válvulas de regulação, V5 – válvula agulha, T – transdutor de pressão.

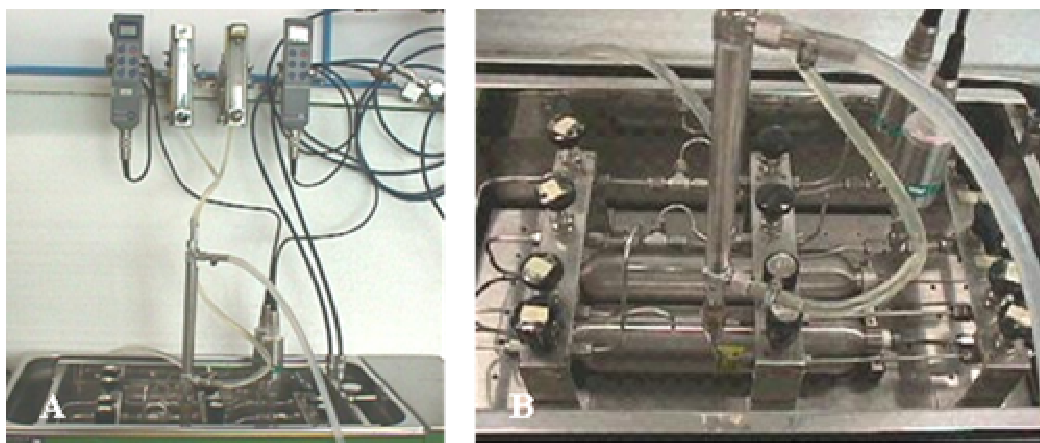


Figura 3.2 Fotografia do biorreator Whitey de 0.3 L. Visualização dos transdutores de pressão e dos rotâmetros (A), e de dois biorreatores hiperbáricos Whitey de 0.3 L (B).

Acoplado à válvula de saída V5 (válvula de agulha), que permite uma regulação mais fina da pressão, está um condensador em aço inox (Certomat®WR-

B.Braun) de tubos concêntricos, refrigerado com água a 4 °C. O caudal de gás de saída é verificado no rotâmetro de ar (Fischer & Porter) e fixo através da regulação das válvulas V4 e V5.

3.1.1.2 Esterilização e lavagem

Antes da primeira utilização e sempre que se variava o microrganismo a instalação era retirada do banho de termostatização e era esterilizada num autoclave a 121°C durante 20 minutos. Este procedimento, se efectuado frequentemente, poderia danificar as ligações das tubagens da instalação, optou-se por isso por “esterilizar” *in situ* entre cada ensaio. Esta esterilização consiste em lavar duas vezes o biorreactor com solução de Betadine (diluída de 1:4) e de seguida cinco vezes com água destilada esterilizada, acompanhada de forte agitação. Após cada ensaio o reactor era lavado com água destilada cinco vezes, antes da esterilização.

3.1.1.3 Condições de operação

A operação do biorreactor inicia-se carregando-o, através de uma bomba peristáltica (Gilson, miniplus 2), com meio de cultura previamente inoculado. O meio de cultura é previamente esterilizado e a inoculação efectua-se imediatamente antes da carga do reactor. Uma vez que o reactor não dispõe de eléctrodo de pH, não era possível efectuar o controlo desta variável ao longo do tempo de cada ensaio. Assim, utilizaram-se meios de cultura tamponados de forma a ultrapassar esta limitação.

Para carregar o reactor, este é despressurizado através da abertura da válvula de descompressão (V3), com as válvulas V1 e V2 fechadas. A introdução do meio é efectuada através de uma bomba peristáltica (Gilson, miniplus 2) cuja ligação é feita por tubagem ligada à válvula de amostragem (V6). Fecha-se a válvula V3, e as restantes válvulas são manipuladas de forma a pressurizar o reactor à pressão e caudal de gás desejados. A pressão era fixada no valor pretendido tendo ocorrido

oscilações até à décima de bar. Liga-se a agitação do reactor e regula-se à temperatura de 30 °C.

3.1.2 Biorreactor Whitey de 1 L

3.1.2.1 *Características do equipamento*

Como o biorreactor Whitey de 0.3 L oferecia algumas limitações como o baixo volume útil de trabalho, 0.15 L e o não controlo do pH, foi projectado um outro reactor de forma a ultrapassar estas limitações. Na Figura 3.3 encontra-se esquematizada a instalação do biorreactor Whitey de 1 L, enquanto que na Figura 3.4 é mostrada uma fotografia do biorreactor e respectivos acessórios.

A instalação que está esquematizada na Figura 3.3 apresenta algumas diferenças em relação à instalação da Figura 3.1. O biorreactor (modelo 304L-HDF4-1000cc da Whitey) também em aço inox 304, tem um volume de 1 L, significando que o volume de trabalho passou a ser de 0.5 L. Tem menos uma válvula, V5 (relativa à Figura 3.1) e possui controlo de pH. O controlo de pH processa-se através de um eléctrodo de pH (Mettler HA405-DXX-58/120) que está imerso no meio de cultura e se encontra ligado a um medidor de pH (Hanna Instruments pH 500) que permite a monitorização continua do valor de pH. A constituição do eléctrodo de pH permite operar até valores de pressão de ar de 10 bar. O sistema de controlo de pH incorpora ainda o módulo de controlo ácido/base, ligado a dois reservatórios, também em aço inox, que contêm o ácido e a base. Quando o pH se encontra abaixo do valor estipulado o módulo de controlo activa a bomba de HPLC (Eldex, modelo B-100-S-2, USA) doseadora da base, e através das válvulas V7 e V8, que se encontram permanentemente abertas, a base ou o ácido entram no meio de cultura, até o valor de pH atingir o valor pretendido.

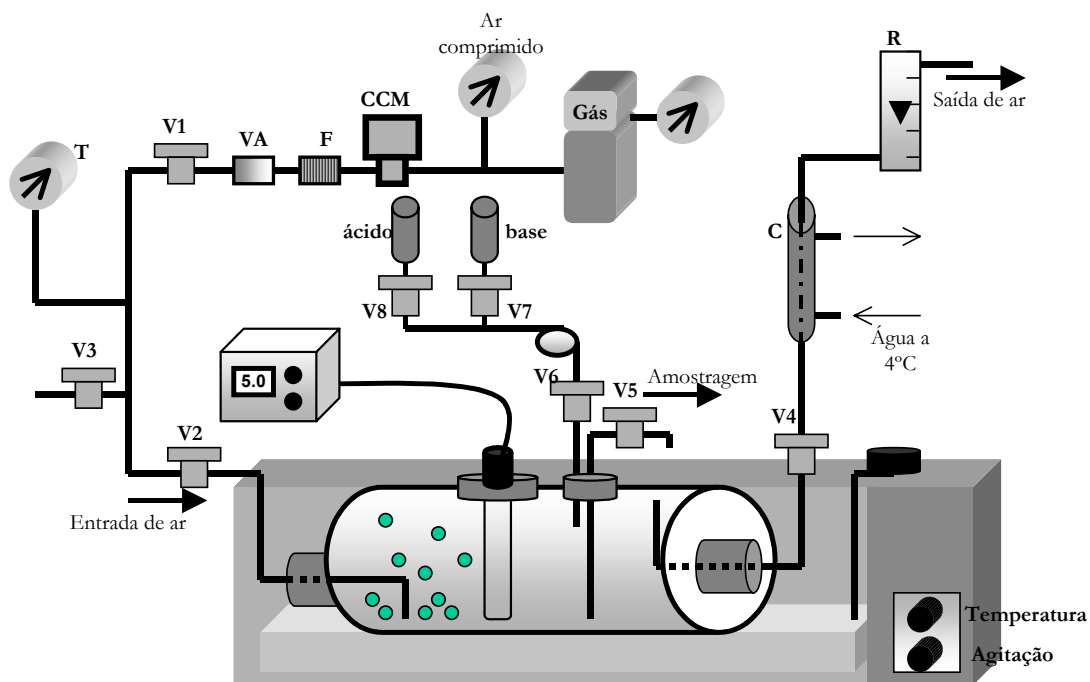


Figura 3.3 Esquema da instalação experimental – biorreator Whitey de 1 L e acessórios: CCM – controlador de caudal mássico, C – condensador, F – filtro de ar, R – rotâmetro de ar, VA – válvula anti-retorno, V1, V3 e V6 – válvulas tudo ou nada, V2 e V4 – válvulas de regulação, V5 – válvula agulha, T – transdutor de pressão.

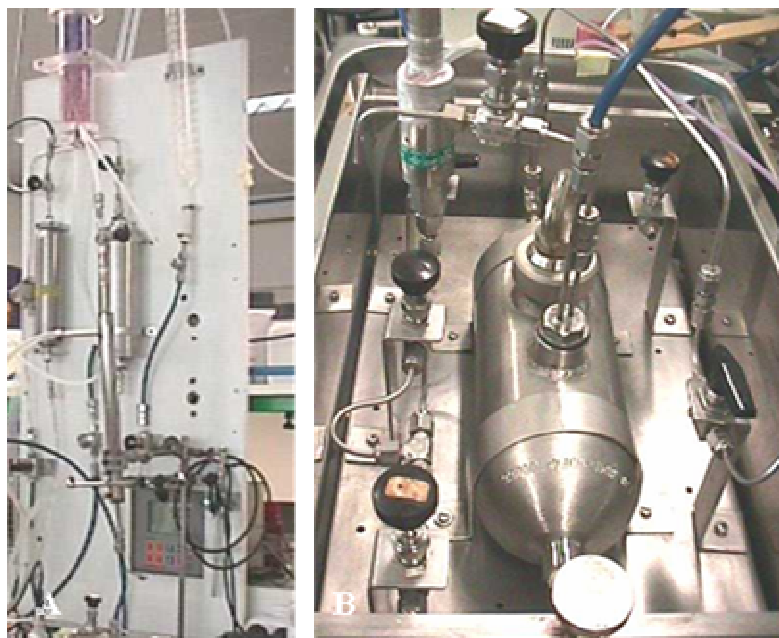


Figura 3.4 Fotografia do biorreator Whitey de 1 L. Visualização dos reservatórios de ácido/base, do condensador e do registrador de pH (A), e do biorreactores hiperbáricos Whitey de 1 L (B).

3.1.2.2 Esterilização, lavagem e condições de operação

Uma vez que se trata de um biorreactor muito semelhante ao anterior, o procedimento relativo à esterilização e lavagem do mesmo são idênticas ao que se descreve no sub-capítulo 3.1.1.2.

Para carregar o reactor de forma a arrancar os ensaios procede-se exactamente da mesma forma que no biorreactor de 0.3 L (sub-capítulo 3.1.1.3).

3.1.3 Biorreactor Parr

3.1.3.1 Características do equipamento

O reactor (modelo 4563, Parr) consiste num tanque agitado de 600 mL de capacidade, construído em aço inox 316 (Figura 3.5), contendo no seu interior um agitador, com dois impulsores em turbina com lâminas inclinadas, accionado pelo motor (M), um circuito de água de refrigeração (A.R.), uma sonda de temperatura e um tubo dispersor por onde é feito o arejamento. Todo o material interno e do topo do reactor é de aço inox 316. A espessura do reactor e o sistema de vedação permite operar até um valor máximo de pressão de 200 bar e a um máximo de temperatura de 350 °C. No topo do reactor existe um disco de ruptura (D) que permite a descompressão do reactor caso a pressão exceda o limite de segurança.

O reactor está acoplado a um módulo de controlo que permite regular a temperatura e a agitação, e medir a pressão no interior do reactor. A temperatura é controlada por meio da manta de aquecimento que envolve o reactor e pelo circuito de água de refrigeração (A.R.), alimentado com água corrente.

A pressão no interior é fixada manualmente ajustando a pressão a montante do reactor e a abertura das válvulas (V3 e V5) de saída do gás. A monitorização da pressão dentro do reactor é efectuada através de um transdutor de pressão (T) ligado ao módulo de controlo. O sistema de pressurização incorpora ainda um controlador de caudal mássico (CCM) (Hastings Instruments, Hampton), um

filtro (F) de ar e uma válvula anti-retorno (V_a). Estas peças estão colocadas na tubagem de entrada do gás.

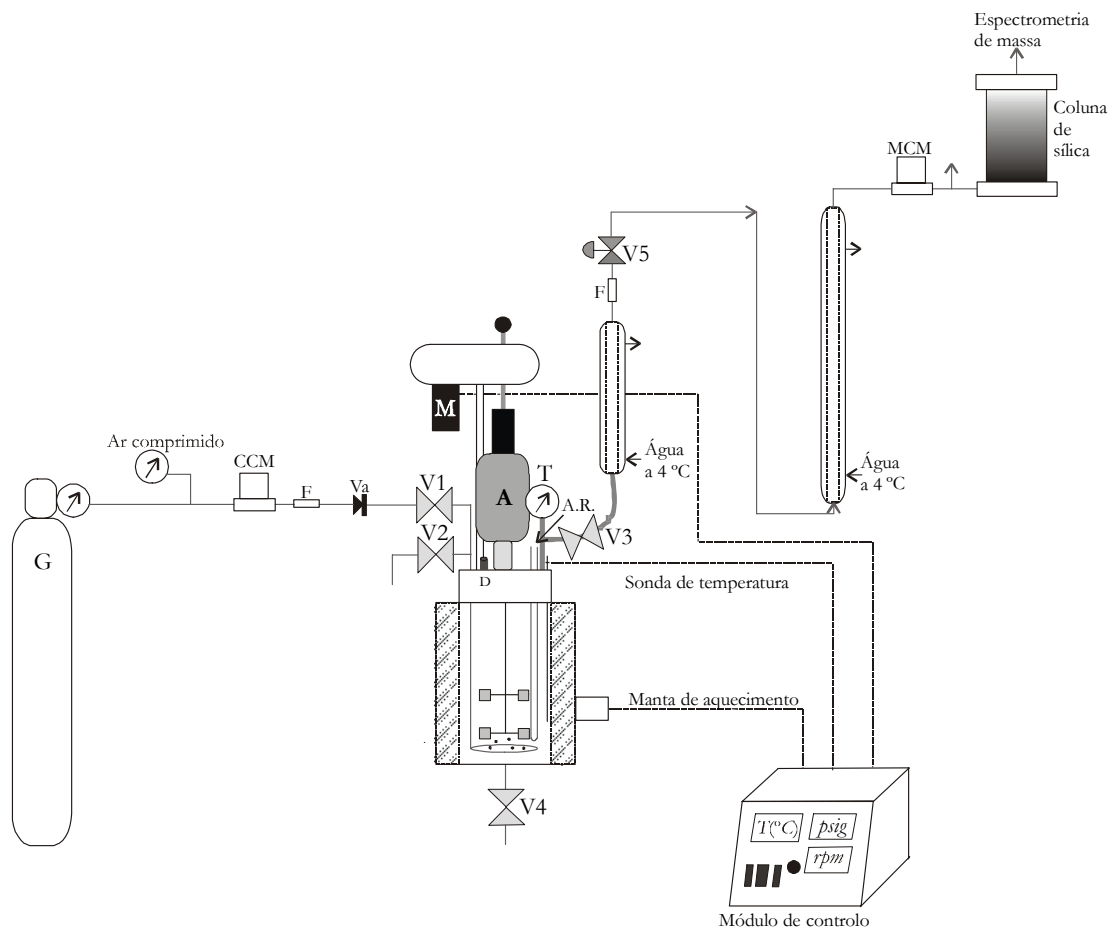


Figura 3.5 Esquema da instalação experimental – biorreactor Parr e acessórios: A – agitador, A.R. – circuito de refrigeração, CCM – controlador de caudal mássico, D – disco de segurança, F – filtro de ar, G – garrafa de gás, M- motor do agitador, MCM – medidor de caudal mássico, V_a – válvula anti-retorno, V_1 , V_2 , V_3 , V_4 – válvulas, V_5 – válvula de regulação, T – transdutor de pressão (Belo, 1999).

À válvula de gás (V_3) do reactor foi acoplado um condensador em aço inox de tubos concêntricos, um filtro e uma válvula agulha (V_5) que permite a regulação mais fina da pressão. O gás de saída passa ainda através de um medidor de caudal mássico (MCM) (Hastings Instruments, Hampton). Os sinais deste medidor, bem como do controlador, são convertidos por uma placa de aquisição de dados (CIO-DAS08JR, Computer Boards) colocada num computador pessoal, onde corre um programa de aquisição e controlo (LABtech Notebook, Datalab

Solution). Esta instalação experimental foi utilizada anteriormente por Belo (1999).



Figura 3.6 Fotografia do biorreator Parr.

3.1.3.2 Esterilização e lavagem

Neste reactor é possível fazer a esterilização interna *in situ* uma vez que permite operar com valores de temperatura e de pressão elevados. A esterilização é efectuada introduzindo no reactor cerca de 200 mL de água destilada. Com todas as válvulas do reactor fechadas, excepto as válvulas V3 e V5, regula-se a temperatura para 121 °C. A válvula V3 é fechada quando a temperatura atinge 90 °C. O aquecimento é desligado após 20 min de esterilização. Tal como os outros biorreactores, também este é lavado antes de ser esterilizado várias vezes, com água destilada.

3.1.3.3 Condições de operação

A operação do reactor inicia-se carregando-o, através de uma bomba peristáltica (MS1 Reglo, Ismatec), com o meio de cultura já inoculado. Tal como os biorreactores descritos anteriormente, este reactor não dispõe de eléctrodo de pH, desta forma, foi necessário utilizar meios de cultura tamponados.

O volume de operação foi sempre 0.4 L, cerca de 2/3 da capacidade do reactor.

Uma vez fixadas as condições de operação (temperatura, velocidade de agitação, caudal de arejamento e pressão), segue-se a evolução do sistema, através da recolha de amostras (V4 ou V2) que vão permitir a monitorização da actividade metabólica e do estado fisiológico das células.

3.2 Ensaios à pressão atmosférica

3.2.1 Biorreactor Biolab

Este biorreactor que opera à pressão atmosférica foi também utilizado em alguns capítulos, nomeadamente, o capítulo 4 (Efeito da pressão no metabolismo de duas estirpes de *Kluyveromyces marxianus*) e o capítulo 5 (Efeito da pressão no metabolismo da levedura *Candida utilis*). Os ensaios decorridos neste biorreactor tiveram como principal objectivo a confirmação da limitação do oxigénio dissolvido em fermentações à pressão atmosférica.

O biorreactor consiste num tanque agitado de 2 L de capacidade máxima, cujo vaso é construído em vidro. Possui um agitador com dois impulsores tipo turbina e um dispersor em anel perfurado para promover o arejamento, o qual é efectuado por uma bomba incorporada no sistema de monitorização e controlo do fermentador. Fazem ainda parte deste sistema as seguintes unidades: medidor e controlador de pH, medidor e controlador de temperatura, motor com controlador de agitação e medidor da concentração de oxigénio dissolvido. O fermentador está equipado com sonda de temperatura, eléctrodo de pH (eléctrodo combinado 465-35-Ka, Mettler Toledo) e sonda polarográfica de oxigénio (12/220 T, Mettler Toledo).

O controlo da temperatura é efectuado por meio de uma resistência instalada no vaso do fermentador. Embora o biorreactor tenha controlo de pH, o qual é efectuado através da unidade de controlo acoplado a duas bombas peristálticas de adição de base e de ácido, este sistema não foi utilizado.

O controlo do caudal de arejamento é realizado manualmente por regulação da válvula de entrada de ar, que está acoplada a um rotâmetro, cujo caudal máximo de ar é de 2.5 L min^{-1} . À entrada do biorreactor, o ar, atravessa um filtro (ampola de algodão) de modo a remover as partículas e microrganismos. A concentração

de oxigénio dissolvido foi monitorizada num medidor externo (170, Mettler Toledo), cujos sinais analógicos foram convertidos e adquiridos por uma placa electrónica (CIO-DAS08JR, Computer Boards) colocada num computador pessoal, onde corre um programa de aquisição e controlo (LABtech Notebook, Datalab Solution), permitindo o registo em ficheiro, de todos os valores da concentração de oxigénio dissolvido ao longo do tempo dos ensaios realizados.

3.2.1.1 Esterilização e condições de operação

A esterilização do fermentador é realizada num autoclave a 121°C durante 20 min. O biorreactor é esterilizado já com o meio e com todos os acessórios que vão ser utilizados no ensaio, como, o eléctrodo de pH, o eléctrodo de oxigénio, as tubagens de entrada e de saída de ar, o filtro de ar e o agitador.

As calibrações das sondas são efectuadas em momentos diferentes, a sonda de pH é calibrada antes de esterilização, e a de oxigénio, depois da esterilização.

Para o arranque dos ensaios, procedeu-se de igual forma aos sub-capítulos anteriores, isto é, o inóculo (10 % do volume de operação) é transferido para o biorreactor através de uma bomba peristáltica. Após inoculação, inicia-se a agitação (200 rpm ou 400 rpm), o controlo de temperatura, a leitura de pH, a leitura de oxigénio dissolvido, e abre-se a válvula do rotâmetro, fixando o caudal de ar em 1.5 L · min⁻¹.

3.2.2 Ensaios com micro-arejamento

Em todos os ensaios com estirpes de leveduras diferentes, e em simultâneo com o ensaio sob pressão, foi realizada um outro ensaio designado de controlo. O objectivo deste controlo era acompanhar o crescimento da levedura de forma a constatar o bom estado da estirpe cultivada no tubo inclinado utilizado, e também, de forma a comparar o efeito de condições de micro-arejamento com os ensaios com pressão de ar ou de oxigénio puro.

3.2.2.1 Esterilização e condições de operação

Os ensaios de controlo foram realizados em matraz. O volume do matraz variava de acordo com o volume do biorreactor de pressão, assim como o volume do meio de cultura. Assim, no caso dos ensaios no biorreactor de 1 L, eram utilizados frascos com capacidade de 1 L com 0.5 L de meio de cultura inoculado. A esterilização do frasco era efectuada em autoclave a 121 °C durante 20 min com o meio de cultura do ensaio. O oxigénio era difundido através da rolha de algodão e gaze. O arranque da operação era em simultâneo com o biorreactor de pressão. O frasco era colocado numa incubadora orbital (Certomat®WR-B.Braun) a 150 rpm e 30 °C.

O inóculo utilizado nos ensaios controlo consiste numa cultura de volume igual a 10 % do volume de operação e com cerca de 12 h de crescimento em incubadora orbital a 150 rpm e 30 °C.

3.3 Determinação da capacidade de transferência de oxigénio

A determinação da taxa de transferência de oxigénio (OTR) e do coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio (k_La) é fundamental para a caracterização de reactores em processos aeróbios. Através destes parâmetros é possível estabelecer o arejamento óptimo e quantificar os efeitos de cada um dos factores que influenciam a transferência de oxigénio (Stanbury e Whitaker, 1984).

Existem diversas formas de determinar o coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio num biorreactor. Os métodos tradicionais mais utilizados dividem-se em dois tipos com base no estado em que são realizados: estado transiente e estado estacionário (Stanbury e Whitaker, 1984).

3.3.1 Métodos em estado transiente

Nos métodos em estado transiente ou também designados por “métodos de degasificação” a determinação do k_La num sistema de fermentação depende da monitorização em linha da concentração de oxigénio dissolvido em solução durante o tempo de arejamento e agitação. A taxa de transferência de oxigénio diminui ao longo do tempo de arejamento à medida que C_L se aproxima de C^* devido ao decréscimo resultante da força motriz (C^*-C_L). A taxa de transferência de oxigénio, para qualquer tempo, será igual ao declive da tangente à curva do oxigénio dissolvido ao longo do tempo.

De forma a medir o oxigénio dissolvido sobre uma gama de valores adequados, é necessário numa primeira fase diminuir o oxigénio até um valor baixo. Existem dois métodos que permitem atingir esta diminuição: método estático e o método dinâmico.

3.3.1.1 Método estático

Nesta técnica inicialmente proposta por Wise (1951), a concentração de oxigénio na solução é diminuída através da introdução de nitrogénio, para que a solução fique sem oxigénio. A solução é novamente arejada e agitada e mede-se então o aumento da concentração de oxigénio através de uma sonda de oxigénio.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_{La} (C^* - C_L) \quad (3.1)$$

Em que,

C^* é a concentração de saturação de oxigénio no líquido.

C_L é a concentração de oxigénio dissolvido.

t é o tempo.

A forma integrada desta equação permite a obtenção do valor de k_{La} , o qual é igual ao simétrico do declive da recta resultante da representação de $\ln (C^* - C_L)$ em função de t (Stanbury e Whitaker, 1984).

3.3.1.2 Método dinâmico

Taguchi e Humphrey (1966) utilizaram a actividade respiratória de microrganismos em crescimento num fermentador de forma a diminuir a concentração de oxigénio em solução. Este método tem a vantagem de ser realizado durante uma fermentação dando um resultado mais realista do k_{La} .

O procedimento envolve duas etapas, uma de paragem do arejamento e outra de retoma do arejamento nas condições de operação. Assim, na primeira etapa, a monitorização do decréscimo da concentração de oxigénio dissolvido permite determinar a taxa específica de consumo de oxigénio através das equações 2.11 e 3.2.

$$\frac{dC_L}{dt} = -OUR \quad (3.2)$$

O arejamento é retomado antes de ser atingido o valor crítico da concentração de oxigénio, valor abaixo do qual o consumo de oxigénio é limitado. Após o reinício do arejamento (2ª etapa), o balanço de massa ao oxigénio na fase líquida é expresso pela equação 2.11.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C_L) - OUR \quad (3.3)$$

Considerando o estado pseudo-estacionário imediatamente antes da determinação, *OUR* pode ser substituído por:

$$k_L a (C^* - C_i) = OUR \quad (3.4)$$

Em que,

C_i é a concentração de oxigénio dissolvido no início da determinação

Integrando-se em seguida a equação 3.4, resulta a equação 3.5.

$$\ln \left(\frac{C_i - C_L}{C_i - C_0} \right) = -k_L a (t - t_0) \quad (3.5)$$

Sendo C_0 e t_0 a concentração de oxigénio dissolvido e o tempo, respectivamente, quando o arejamento é retomado. A representação do termo do lado esquerdo da equação 3.5, em função do tempo, origina uma recta cujo declive é $-k_L a$.

3.3.2 Métodos em estado estacionário

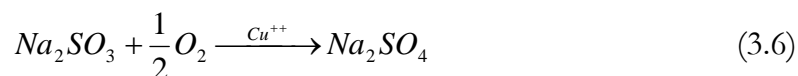
Neste tipo de método não se mede a concentração ao longo do tempo com uma sonda, uma vez que se baseiam na absorção do oxigénio, em estado estacionário, da fase gasosa para a fase líquida, em sistemas que consomem o oxigénio na fase líquida.

Um exemplo deste método é o método da oxidação do sulfito, no qual a transferência de oxigénio envolve uma reacção química rápida que consome o oxigénio.

Uma vez que, não era possível a incorporação de uma sonda de oxigénio nos biorreactores de pressão, foi utilizado o método estacionário, pois este método não exige a continua monitorização da concentração de oxigénio dissolvido

3.3.2.1 Método da oxidação do sulfito

Esta técnica, inicialmente proposta por Cooper *et al.* (1944), não requer a medição da concentração de oxigénio dissolvido, apenas se baseia na taxa de conversão de uma solução de sulfito de sódio, $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, a sulfato de sódio, na presença de um catalisador de cobre ou cobalto, de acordo com a reacção representada pela seguinte equação:



A reacção é tão rápida que à medida que o oxigénio entra em solução é imediatamente consumido na oxidação do sulfito e consequentemente a concentração de oxigénio dissolvido, é praticamente nula ($C_L=0$). Desta forma a taxa da transferência de oxigénio é metade da variação no tempo da concentração (expressa em moles por litro) de sulfito aquoso:

$$\text{OTR} = \frac{1}{2} \frac{dC_{\text{SO}_3}}{dt} = k_L a C^* \quad (3.7)$$

Onde C_{SO_3} é a concentração do ião SO_3^{2-} . O factor, $1/2$, requer que a concentração de sulfito (C_{SO_3}) e do oxigénio dissolvido (C^*) esteja expressa em moles. A solubilidade do oxigénio, C^* , é uma constante dependente da composição do meio, temperatura e pressão, e pode ser medida separadamente.

Assim,

$$k_L a = \frac{1}{2} \frac{dC_{SO_3}/dt}{C^*} \quad (3.8)$$

Este método é frequentemente utilizado em diversos trabalhos de investigação sobre o estudo da taxa de transferência de oxigénio em biorreactores, especialmente em biorreactores hiperbáricos (Sato *et al.*, 1981; Baldwin *et al.*, 2000; Maier *et al.*, 2001).

Neste trabalho não foi possível medir o valor de C^* , necessário para o cálculo de $k_L a$. Em vez disso, o valor de C^* foi estimado recorrendo à lei de Henry (equação 2.9). A definição mais comumente utilizada da lei de Henry diz que a solubilidade de um gás num líquido é directamente proporcional à sua pressão parcial nesse gás. No entanto, esta definição nem sempre é aplicável, pois mesmo em sistemas com pressão parcial aparentemente baixa esta definição pode apresentar desvios consideráveis. A lei de Henry pode ser modificada entrando em consideração com o coeficiente de fugacidade (não idealidade do vapor), devido ao aumento da pressão e com o coeficiente de actividade (não idealidade do líquido), devido ao aumento da concentração do soluto.

Assim, para quantificar os desvios à lei de Henry para os valores de pressão superiores à atmosférica, e para gases relativamente pouco solúveis, utilizou-se uma equação proposta por Krichevsky-Kasarnovsky (equação 3.9) (Prausnitz *et al.*, 1986), a qual inclui vários parâmetros como a fugacidade, a fracção molar do oxigénio no líquido, a pressão de saturação do líquido, a constante dos gases ideais, a temperatura e o volume molar parcial de oxigénio no líquido.

Concluiu-se, que para a gama de valores de pressão estudados neste trabalho (1.2 bar a 12 bar) o desvio à lei de Henry é desprezável, *i.e.*, é perfeitamente

aceitável a aproximação da fugacidade à pressão do oxigénio puro, ou à sua pressão parcial no ar.

$$\ln \frac{f_i}{x_i} = \ln H_{ij}^0 + \frac{v_i^\infty (P - P_j^0)}{RT} \quad (3.9)$$

Em que,

f_i é a fugacidade do soluto i na fase gasosa

x_i é a fracção molar do soluto i na fase líquida

H_{ij}^0 é a constante de Henry à pressão de referência, que normalmente é a pressão de saturação do solvente

v_i^∞ é o volume molar parcial do soluto i no líquido a diluição infinita ($33 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ a 30°C)

R é a constante dos gases ideais

T é a temperatura

P é a pressão

P_j^0 é a pressão de saturação do líquido j à temperatura T (pressão de referência)

O valor de C^* calculado, aplicado a sistemas de água pura, deve ser corrigido para soluções com substâncias dissolvidas, como por exemplo, sais (Na_2SO_4).

Recorreu-se ao modelo empírico proposto por Schumpe *et al.* (1982) e baseado na equação de Shenenov, para a estimativa da solubilidade de oxigénio dissolvido em soluções de sulfato de sódio. Para uma solução de Na_2SO_4 , 0.2 M a 25°C , obteve-se que a solubilidade do oxigénio corrigida é igual à solubilidade do oxigénio na água, nas condições de pressão e temperatura pretendidas, multiplicada por um factor de 0.86.

Procedimento experimental

No procedimento experimental utilizou-se uma solução de Na_2SO_3 , 0.2 M, e CuCl_2 0.001 M. São recolhidas amostras ao longo do tempo, às quais se adiciona solução de iodo 0.05 M em excesso. Os volumes de amostra e da solução de iodo têm que ser rigorosamente medidos.

O iodo em excesso em cada tempo foi determinado através da leitura da absorvência a 595 nm e convertido para concentração molar (C_{I_2}) utilizando uma calibração prévia.

A concentração de sulfito presente no reactor no momento da recolha da amostra foi calculada por:

$$C_{SO_3} = \frac{0.05V_I - (V_I + V_a)C_{I_2}}{V_a} \quad (3.10)$$

Em que,

V_a é o volume de amostra, mL.

V_I é o volume de solução de iodo adicionado, mL.

3.4 Determinação dos rendimentos, produtividade e taxas específicas de crescimento

Em vários ensaios e para comparação entre os mesmos foi necessário calcular diversos parâmetros cinéticos e estequiométricos, como o rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$) e etanol ($Y_{E/S}$), a produtividade (P) ao fim do tempo de operação e a taxa específica de crescimento (μ). Na Tabela 3.1 encontram-se as equações utilizadas no calculo destes parâmetros no caso das operações em descontínuo e em semi-contínuo com caudal de alimentação constante.

Tabela 3.1 Equações para calcular os parâmetros de crescimento e de consumo.

Modo descontínuo	Eq.	Modo semi-contínuo	Eq.
$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$	(3.11)	$Y_{X/S} = \frac{X_f V_f - X_0 V_0 + \sum_i X_{ai} V_{ai}}{S_0 V_0 - S_f V_f + S_F \int_0^{t_f} F(t) dt}$	(3.12)
$Y_{E/S} = \frac{E_f - E_0}{S_0 - S_f}$	(3.13)	$Y_{E/S} = \frac{E_f V_f - E_0 V_0 + \sum_i E_{ai} V_{ai}}{S_0 V_0 - S_f V_f + S_F \int_0^{t_f} F(t) dt}$	(3.14)
$P_X = \frac{X_f - X_0}{t_f}$	(3.15)	$P_X = \frac{X_f V_f - X_0 V_0 + \sum_i X_{ai} V_{ai}}{(V_f - V_0)t_f}$	(3.16)
$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$	(3.17)	$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + D$	(3.18)
$q_S = \frac{\mu}{Y_{X/S}}$	(3.19)	$q_S = \frac{D(S_{F-S})}{X} - \frac{1}{X} \frac{dS}{dt}$	(3.20)

Nas equações anteriores os índices o, f e ai correspondem às condições iniciais, finais e de cada amostra respectivamente. Nas equações de cálculo dos

rendimentos em biomassa e etanol para o modo semi-contínuo, o somatório no numerador representa a massa de células e de etanol removida do reactor nas amostras, de forma a corrigir o respectivo valor. As taxas específicas de crescimento e de consumo de substrato são determinadas recorrendo às curvas de variação da concentração celular e de substrato ao longo do tempo de operação.

3.5 Análise de imagem e métodos microscópicos

3.5.1 Análise de Imagem

O processamento por análise de imagem é o processo de manipulação das imagens através do computador com o objectivo de extrair o máximo de informação acerca dos objectos que constam na imagem, sendo ainda uma área multidisciplinar a qual envolve elementos ópticos, electrónicos, matemáticos e de engenharia (Roerdink, 1998).

Nos últimos tempos os sistemas de análise e processamento de imagem têm tido um grande impacto na investigação biotecnológica, tornando-se assim uma ferramenta indispensável em diversas áreas científicas (Vecht-Lifshitz e Ison, 1992; Thomas e Paul, 1996).

O recurso à tecnologia de vídeo e o constante desenvolvimento dos computadores e dos programas informáticos tem permitido que esta técnica esteja já ampliada a uma vasta gama de metodologias (Vecht-Lifshitz e Ison, 1992).

Os sistemas de análise de imagem mais económicos e mais simples envolvem um computador para o processamento da imagem. A imagem é captada através de uma câmara de vídeo colocada num microscópio, sendo posteriormente processada através do computador (Thomas e Paul, 1996).

A análise de imagem (AI), propriamente dita, envolve a digitalização de uma imagem numa matriz de pontos ou de elementos de fotografia, pixeis, assim como a medida da intensidade de luz de cada ponto. As imagens a preto e branco podem ser adquiridas e tratadas através de uma escala em tons de cinzento, no caso de imagens a cores, estas são tratadas através de um conjunto de três intensidades de cores: vermelho, verde e azul (Vecht-Lifshitz e Ison, 1992).

Existem diversas etapas que estão associadas ao tratamento de uma imagem: observação da imagem, aquisição da imagem, detecção e cálculo das propriedades pretendidas relativas à imagem, processamento e armazenamento dos dados. As operações típicas aliadas ao processamento de uma imagem incluem a correcção de sombra, aumento de contraste, aplicação de factores de forma, etc. Os sistemas de análise computacional têm vantagens em relação ao ser Humano, em termos de memória, análises quantitativas e tarefas repetitivas. Claro, que, por sua vez os computadores têm o defeito de não serem selectivos em termos de interpretação e de resposta a defeitos de uma imagem (Thomas e Paul, 1996).

Existem diversos métodos para fazer a estimativa da quantidade de células presentes no meio de fermentação, sendo a determinação do peso seco e a observação microscópica, dois exemplos de métodos em diferido que são frequentemente utilizados. No entanto, para a contagem microscópica é necessária a contagem de um elevado número de células de forma a obter um resultado que seja representativo da amostra, tornando-se assim, numa tarefa tediosa e bastante morosa (Yamashita *et al.*, 1993; Sieracki e Viles, 1998) e acabando por ser encarado como um método qualitativo. Contrariamente a estes métodos em diferido, têm sido propostos e desenvolvidos métodos de análise em linha, da concentração celular, aplicados em biorreactores industriais, com vista ao controlo e operação de um processo (Zalewski e Buchholz, 1996).

3.5.1.1 Aplicações da análise de imagem

As principais áreas de aplicação da análise de imagem, envolvendo a utilização de um microscópio, vão desde a sequenciação do ADN, passando pela contagem de células, até à análise de resíduos de pólvora de armas de fogo. A análise de imagem pode também ser utilizada ao nível macroscópico, como por exemplo na análise de achados arqueológicos (Vecht-Lifshitz e Ison, 1992).

A técnica de análise de imagem pode ser aplicada em biorreactores, tendo como objectivo a caracterização da biomassa (fungos, bactérias, leveduras, células

vegetais e animais), em relação ao seu tamanho, à sua morfologia e à sua fisiologia, assim como a caracterização do comportamento de reactores multifásicos (parâmetros de escoamento, velocidades, tamanhos de bolhas e distribuição de formas) (Ferreira *et al.*, 2001).

Em todos os casos, a diminuição dos custos dos computadores tornam esta técnica ainda mais acessível. O desenvolvimento da análise de imagem a cores e baseada em técnicas de fluorescência tornaram esta técnica ainda mais atractiva para o aumento do conhecimento sobre a fisiologia celular, para a monitorização e controlo das culturas celulares (Thomas e Paul, 1996) e para a determinação da viabilidade celular (Pinheiro *et al.*, 1998).

São vários os trabalhos desenvolvidos com o objectivo de tornar esta técnica cada vez mais precisa e expedita no estudo do crescimento microbiano. Por exemplo, O'Shea e Walsh (1996) monitorizaram quantitativamente a geometria de células e de filamentos de levedura de *Kluyveromyces marxianus*, durante a fermentação do soro de queijo. Zalewski e Buchholz (1996) recorreram ao processamento por análise de imagem para fazer estimativas em linha acerca da heterogeneidade morfológica (células simples, células gemulantes, agregados de 4 células ou mais). Este tipo de trabalho é fundamental para um melhor controlo da produtividade industrial das fermentações (Walker, 1998). Esta metodologia tem sido ainda estudada na compreensão dos mecanismos que levam à inactivação e morte das células quando sujeitas a elevadas pressões hidrostáticas, durante o processo de esterilização utilizado na indústria alimentar (Perrier-Cornet *et al.*, 1995). De facto, trata-se de uma técnica aplicada em vários trabalhos os quais procuram a caracterização morfológica de vários sistemas biológicos, entre os quais culturas de fungos (Cox e Thomas, 1992), de protozoários (Amaral *et al.*, 1999) e de bactérias (Azeredo *et al.*, 1997).

Procedimento experimental

O sistema de análise de imagem é constituído por um microscópio óptico (Diaphot 300, Nikon Corp.), ao qual está acoplada uma câmara de vídeo a preto e branco (Sony CCD AVC D5CE, Japão) para a captação das imagens. A visualização das imagens e respectiva gravação é efectuada num computador pessoal através de uma placa de aquisição (DT3155, Data Translation, Inc.) e de um programa captor (Image Pro 3.0, Média Cybernetics) e de processamento de imagens (Matlab, versão 6.1/windows, release 12.1, The Mathworks).

As células foram observadas imediatamente após recolha das amostras sem qualquer tratamento prévio. Foi utilizada uma ampliação no microscópio de 400x. Foram captadas 12 a 15 imagens para cada amostra recolhida de forma a obter um número total de células próximo de 300. Para evitar irregularidades no fundo da imagem da amostra de células, foi adquirida também uma imagem, sem células, que funcionava como branco no posterior tratamento das respectivas amostras.

Após adquirida, as imagens são posteriormente processadas (luminosidade, contraste e brilho) de modo a aumentar o contraste e consequentemente, definir melhor o limite de cada objecto na imagem. A imagem original de cada amostra foi dividida pelo seu respectivo branco (imagem de fundo). Esta imagem foi filtrada por um filtro médio (3x3) antes da etapa de binarização. Posteriormente foram suprimidos os objectos que ficavam nos bordos da imagem. A imagem final foi obtida após aplicação das operações morfológicas, tais como, a erosão (para retirar pequenos restos celulares) e a reconstrução. A partir das imagens tratadas foi então possível marcar os objectos em cada imagem permitindo a determinação das propriedades individuais: área, diâmetro, o comprimento e largura (Figura 3.7) (Roerdink, 1998; Sieracki e Viles, 1998; Coelho *et al.*, 2002). Estes dados são expressos em pixel, sendo 1 pixel igual a $4.09\ \mu\text{m}$, este dado foi obtido após uma prévia calibração.

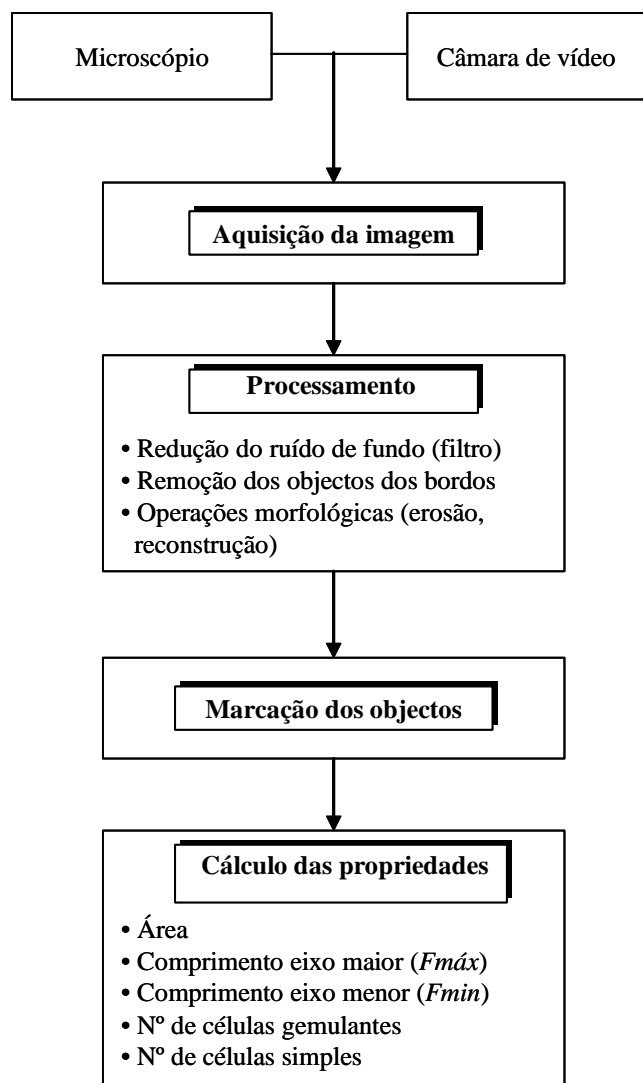


Figura 3.7 Esquema do procedimento da técnica de Análise de Imagem para a obtenção das propriedades individuais das células de levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 e *Candida utilis* CBS 621. No caso da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 não foi determinado o número de células gemulantes, nem o número de células simples, apenas o número de células totais.

O tratamento da imagem foi realizado com base num programa automático de tratamento das imagens sendo possível determinar o número de gémulas presentes em cada amostra (no caso da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894), uma vez que o programa permite separar dois ou mais

objectos que estejam juntos. Foi ainda avaliado o parâmetro $F_{m\acute{a}x}/F_{m\acute{i}n}$, definido pela razão entre o comprimento do eixo maior da célula e o comprimento do eixo menor da célula. Sendo este último designado de alongamento no caso da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, e de circularidade, no caso da levedura *Candida utilis* CBS 621. Se a estirpe apresenta uma forma oval, próxima da esférica, este parâmetro terá um valor igual ou muito próximo da unidade, querendo dizer que a área projectada da célula tem uma forma circular (Pons e Vivier, 1998; Sieracki e Viles, 1998).

3.5.2 Métodos microscópicos

Na determinação da viabilidade celular utilizaram-se dois métodos microscópicos diferentes: epifluorescência (com alaranjado de acridina) e campo claro com contraste de fase (com azul de metileno). Tendo sido utilizado um microscópio óptico, ZEISS, Axioskop.

3.5.2.1 Epifluorescência com alaranjado de acridina

A técnica de microscopia de fluorescência tem sido utilizada por diversos autores (Hobbie *et al.*, 1977; Rodrigues e Kroll, 1985; Raynal *et al.*, 1994; Pinheiro *et al.*, 1998) na contagem da viabilidade celular. De facto, este corante é usado em kits de biologia molecular para a determinação da viabilidade celular de leveduras, como por exemplo o kit Live/Dead yeast viability kit (marca Probes for yeast viability, L-7009).

Quando as moléculas de alaranjado de acridina se ligam à cadeia de ARN (ácido ribonucleico), que está presente nas células em grande quantidade quando estas crescem exponencialmente, as células apresentam uma fluorescência laranja/vermelha (Figura 3.8). Pelo contrário, quando se liga ao ADN (ácido desoxirribonucleico), que predomina nas células mortas ou com baixa taxa de reprodução, as células fluorescem verde/amarelo (Figura 3.8).

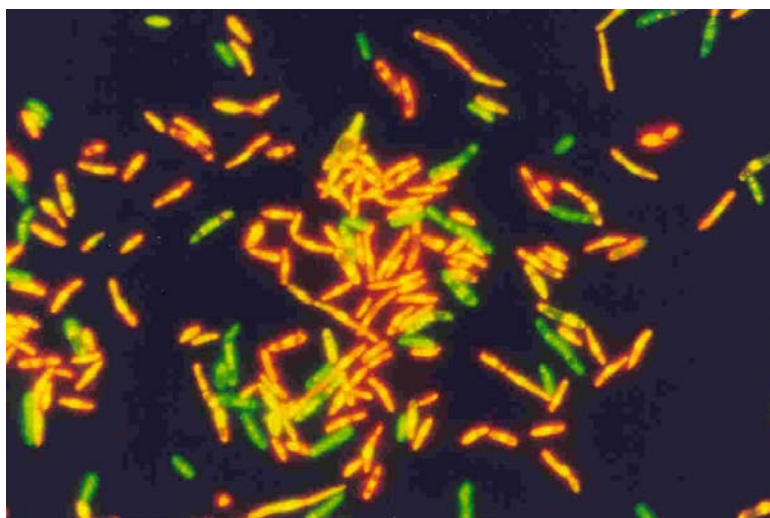


Figura 3.8 Imagem de uma fotografia de microscopia de fluorescência de células *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, coradas com alaranjado de acridina (Ampliação microscópica de 400x).

Procedimento experimental

Para a preparação da fluorescência lavaram-se as células 4 vezes com solução tampão fosfato de sódio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0. De seguida efectuou-se uma diluição à suspensão de forma a obter uma concentração celular inferior ou igual a $0.06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Adicionou-se, à preparação diluída, uma solução de alaranjado de acridina 0.1 % (p/v) de maneira a obter uma concentração final de 0.01 % (p/v). Deixou-se a incubar durante 15 min, na ausência de luz. De seguida, a preparação foi observada ao microscópio de fluorescência com o filtro apropriado de UV 450 nm-490 nm.

A fracção de células viáveis é estimada pela razão entre o número de células de cor laranja/vermelho e o número total de células.

Preparação do tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7.0

Dissolve-se 2.17 g de hidrogenofosfato de sódio e 1.52 g de dihidrogenofosfato de sódio dihidratado em 1 L de água destilada.
Acerta-se o pH a 7.0

3.5.2.2 Microscopia de campo claro com contraste de fase

Neste método recorreu-se ao corante azul de metileno (Jones, 1987). O azul de metileno apresenta uma coloração azul na sua forma oxidada, tornando-se incolor quando reduzido.

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em adicionar, a um dado volume de amostra, um volume igual de solução de azul de metileno $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e incubar durante 5 min. Findo este tempo a suspensão é imediatamente observada ao microscópio em campo claro com contraste de fase.

A fracção de células viáveis é a razão entre o número de células não coradas de azul e o número total de células.

3.6 Métodos analíticos

Nos ensaios efectuados com as diferentes estirpes de leveduras, efectuaram-se análises de amostras que são comuns à caracterização do comportamento metabólico e fisiológico de microrganismos em crescimento em biorreactor. Incluem-se a determinação da concentração celular, viabilidade celular, componentes intracelulares, concentração de substrato e metabolitos. Recorreu-se ainda à técnica de análise de imagem para estudar possíveis alterações morfológicas das células sobre condições de pressão (esta análise não foi efectuada em todos os capítulos).

A concentração celular, a viabilidade celular e a análise à morfologia celular, foram determinadas logo após a recolha da amostra. Para as restantes análises, após centrifugação (5 min a 5000 g) (centrifuga: modelo Sigma 112, Certomat® WR-B.Braun), congelaram-se as amostras a -20°C , quer os sobrenadantes, quer os sedimentos celulares, para doseamento posterior.

3.6.1 Concentração celular

A quantificação da concentração de células foi efectuada através da leitura da absorvência da amostra, ou da amostra diluída, contra um branco de água destilada. Foi utilizado um comprimento de onda de 620 nm para as diferentes estirpes de leveduras.

A conversão dos valores de absorvência para concentração de células expressa em grama de peso seco por litro ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi efectuada através das respectivas rectas de calibração, previamente obtidas (Apêndice A).

Procedimento experimental

O procedimento experimental para obtenção das equações das rectas de calibração para cada espectrofotómetro e para cada estirpe, consistiu em filtrar

15 mL de uma suspensão de células previamente crescidas (fase exponencial), através de membranas de $0.45\ \mu\text{m}$ de porosidade (Gelman Sciences). As membranas foram colocadas numa estufa a $105\ ^\circ\text{C}$ durante 24 h ou até peso constante. O peso foi obtido por diferença entre o peso final e o peso inicial das membranas, submetidas ao mesmo tratamento. Simultaneamente, preparam-se várias diluições de suspensão de células e procedeu-se à leitura da absorvência. O ajuste a uma recta dos pontos experimentais de absorvência e concentração de células constitui a recta de calibração.

3.6.2 Concentração de substrato

3.6.2.1 *Lactose*

A lactose é um dissacarídeo composta por uma molécula de glucose e outra de galactose. A concentração de lactose foi estimada pelo doseamento dos açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (Miller, 1959). Os açúcares redutores em presença de uma base reduzem o ácido 3,5-dinitrossalicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, por oxidação dos seus grupos carbonilo e carboxilo. A presença do sal de La Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio) protege a acção do oxigénio.

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em adicionar num tubo de ensaio, 0.5 mL de amostra a 0.5 mL de reagente DNS, agitar e colocar num banho a 100°C durante 5 min. Após arrefecimento, adiciona-se 5 mL de água destilada e lê-se a absorvência a 540 nm. Para o branco substitui-se a amostra por água destilada e segue-se o mesmo procedimento. A concentração de lactose foi determinada recorrendo a uma recta de calibração de absorvência (540 nm) versus grama de lactose por litro (soluções padrão de lactose de $0.05\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Apêndice A). A calibração foi efectuada sempre que se preparava novo reagente DNS.

Preparação do reagente DNS:

Dissolve-se 5.0 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 100 mL de NaOH 2 M a 80 °C
Dissolve-se 150.0 g de sal de La Rochelle em 250 mL de água destilada a 80 °C
Misturam-se as duas soluções e completa-se o volume a 500 mL com água destilada

3.6.2.2 Sacarose

Tal como a lactose, a sacarose é também um dissacarídeo composta por moléculas de açúcares redutores: uma molécula de frutose e uma molécula de glucose. No entanto, ao contrário da lactose, a sacarose não é um açúcar redutor, tornando-se necessário proceder à quebra da ligação entre as duas moléculas de monossacarídeos através de uma hidrólise ácida. Só desta forma se poderá utilizar o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (Miller, 1959), o qual se liga aos açúcares redutores. Desta forma procedeu-se previamente à hidrólise da sacarose com ácido clorídrico, e posteriormente doseou-se a concentração de açúcares redutores através do método do ácido 3,5-dinitrossalicílico.

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em adicionar a 1 mL de amostra a 0.02 mL de ácido clorídrico a 75 %, agitar e colocar num banho a 90 °C durante 5 min. Deixar arrefecer e neutralizar com 0.05 mL de KOH 5 mol·L⁻¹. Posteriormente proceder ao método descrito anteriormente para a determinação da concentração de lactose (3.6.2.1). A concentração de sacarose foi determinada recorrendo a uma recta de calibração de absorvência (540 nm) versus grama de sacarose por litro (soluções padrão de sacarose de 0.05 g·L⁻¹ a 2 g·L⁻¹) (Apêndice A). A calibração foi efectuada sempre que se preparava novo reagente DNS.

3.6.3 Metabolitos

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) foi utilizada para determinar a concentração de etanol presente nas amostras. O sistema utilizado (Jasco) dispõe de um detector de índice de refração (830-PU, Jasco), uma coluna *Organic*

acids da Chrompack, um forno e controlador de temperatura da coluna (Chrompack) e uma bomba 880-PU (Jasco).

O eluente consiste numa solução de H_2SO_4 0.01 N, que é previamente filtrado por membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ de porosidade e desgaseificado em banho de ultrasons (Sonicador SC 52).

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em injectar a amostra, previamente filtrada por membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ de porosidade, na coluna aquecida a $60\ ^\circ\text{C}$. A amostra é arrastada pela coluna a um caudal de eluente de $0.75\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, apresentando um tempo de retenção de 12.5 min. A concentração do etanol é obtida através de uma recta de calibração realizada com soluções padrão do componente ($0.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $10\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Apêndice A).

3.6.4 Componentes intracelulares

Os componentes intracelulares analisados foram o conteúdo em ATP (adenosina trifosfato), expresso em termos de massa de ATP por unidade de peso seco de células ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), a actividade da enzima β -galactosidase (no caso da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, capítulo 4), expressa em unidades de actividade por grama de peso seco ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$), e a actividade das enzimas anti-oxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione reductase (GR), expressas em unidades de actividade por miligrama de proteína total solúvel ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Apenas no capítulo 6 (Resposta da levedura *Kluyveromyces marxianus* ao stresse oxidativo) se referem e doseiam as enzimas anti-oxidantes.

3.6.4.1 Conteúdo em ATP

O método mais comum para a estimativa do ATP em culturas em descontínuo envolve a quantificação das concentrações de biomassa e de metabolitos no final do crescimento, quando o substrato é totalmente consumido, para o posterior

cálculo dos balanços de massa. Contudo este método está sujeito a um elevado número de incertezas (Gikas e Livingston, 1993).

Para a análise ao ATP recorreu-se ao princípio da bioluminescência, o qual se baseia na geração de pirofosfato e luz (bioluminescência) que é medida em unidades relativas de luz (URL), quando o ATP é convertido em adenosina monofosfato através do sistema luciferina-luciferase (Figura 3.9). Para esta determinação recorreu-se a um luminómetro (Biocounter M2500, Lumac), o qual permite a injeção automática dos reagentes necessários: solução extractante e solução enzimática. Foram utilizados dois conjuntos de reagentes apropriados (NRB/Lumit-PM da Lumac e FL-ASC da Sigma). O facto de se ter recorrido a dois kits para a determinação do ATP, para as diferentes estirpes, explica as diferenças encontradas entre a grandeza de valores obtidos, por isso não é possível comparar os resultados obtidos entre as duas estirpes de *Kluyveromyces marxianus* e a estirpe de *Candida utilis* estudadas.

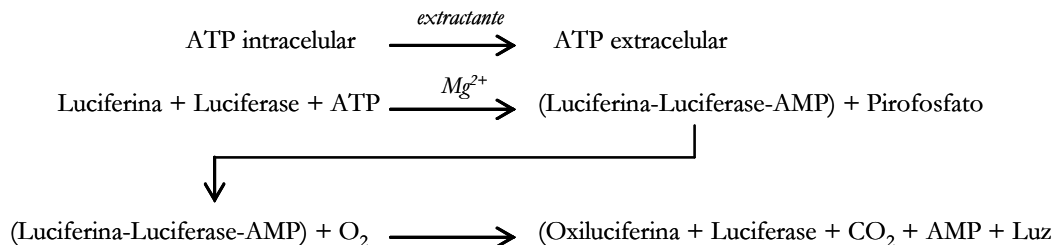


Figura 3.9 Representação esquemática do sistema reaccional utilizado para analisar a o conteúdo em ATP intracelular.

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em centrifugar (5000 g, 5 min) a amostra e ressuspender o sedimento em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, antes da análise. Esta efectuou-se através da adição de 100 µL de amostra, após diluição, quando necessária, para a câmara de contagem do bioluminómetro. Após a injeção automática (programa inserido no aparelho) da

solução extractante e da solução de enzima para a câmara de contagem, é obtida a resposta do aparelho em URL.

Preparação do tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7.8, 0.1 mM EDTA

Dissolve-se 6.49 g de hidrogenofosfato de sódio, 0.66 g de dihidrogenofosfato de sódio dihidratado e 74.4 mg de EDTA em 2 L de água destilada.
Acerta-se o pH a 7.8

A concentração de ATP foi obtida através da recta de calibração entre a resposta do aparelho (URL) e a concentração de soluções padrão de ATP, para cada conjunto de reagentes (Apêndice A).

3.6.4.2 Actividade da β -galactosidase

No doseamento da enzima β -galactosidase utilizou-se o teste do p-nitrofenol- β -galactosido (pNPG). Este método consiste na adição de um substrato, neste caso o pNPG, à solução de amostra. A reacção é catalizada pela enzima β -galactosidase na qual, o substrato incolor pNPG, é hidrolisado em galactose e num composto amarelo, p-nitrofenol (pNP). A reacção é seguida através do aumento da concentração deste produto, que é facilmente determinada espectrofotometricamente.

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em adicionar a uma microplaca 100 μ l de amostra diluída (várias diluições) e 100 μ l de tampão Z com sarcosil, 0.2 %. A microplaca vai a incubar a uma temperatura de 30°C durante 30 min. Findo este tempo adiciona-se a todos os poços, excepto aos que têm branco, 50 μ l de pNPG, 4 g \cdot L⁻¹, e volta-se a incubar a microplaca a uma temperatura de 30 °C durante 5 min. Após este tempo lê-se a absorvência a um comprimento de onda de 405 nm de 1 min em 1 min durante 5 min. Para a leitura da absorvência foi utilizado um espectrofotómetro ELISA (Rainbow, Tecan). Para cada diluição de

suspensão celular faz-se um branco contendo todos os componentes excepto o substrato pNPG. O valor de cada branco é subtraído ao valor do respectivo ensaio.

Preparação do Tampão Z

Dissolve-se 8.54 g de Na_2HPO_4 8, 5.5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ com 0.75 g de KCl
Junta-se 0.25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Perfaz-se a 1000 mL com água destilada
Ajusta-se a pH 7.0

Para o cálculo das unidades por mililitro de amostra para cada doseamento, aplicou-se a fórmula da equação 3.21. Uma unidade de actividade (1 U) é definida como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de pNPG por minuto a 25 °C. A actividade específica é obtida a partir da divisão do valor em unidades por mililitro pelo valor da concentração celular para essa amostra.

$$\beta - \text{galactosidase } (\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{\beta \times d}{\varepsilon} \quad (3.21)$$

Em que,

β é o valor do declive resultante da cinética da reacção de hidrólise, $\Delta A_{405} \cdot \text{min}^{-1}$

d é o factor de diluição

ε é o coeficiente de extinção molar do pNP, $6.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

3.6.4.3 Ruptura das células de levedura

Para proceder à análise das enzimas intracelulares foi necessário fazer a ruptura das células e consequentemente libertar os componentes intracelulares.

Após recolha das amostras estas foram centrifugadas e os sedimentos foram lavados com tampão fosfato de sódio pH 7.8, 50 mM, 0.1 mM de EDTA e posteriormente mantidos a -20°C em 700 μL do mesmo tampão de lavagem. Antes de efectuar a ruptura as amostras foram descongeladas no gelo (0°C).

Foram utilizados dois métodos de ruptura mecânica: moinho de bolas e vortex, ambos com esferas de vidro.

3.6.4.3.1 Vortex

Este método foi utilizado para a ruptura das células de levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022.

Após descongelar as amostras adiciona-se ao tubo de centrífuga com o sedimento 100 μL de esferas de vidro (diâmetro médio igual a 0.5 μm) e agita-se vigorosamente no vortex fazendo ciclos de 1 min com intervalos de 1 min no gelo. As amostras são então centrifugadas durante 15 min a 5000 g a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para mangas de diálise (1400 de diâmetro de rejeição) e procedeu-se à diálise em tampão fosfato de sódio pH 7.8, 50 mM, 0.1 mM de EDTA, durante um período de cerca de 16 horas a 4 °C com agitação.

Após a diálise, as amostras são recuperadas das mangas de diálise para posterior doseamento da proteína total e das enzimas anti-oxidantes.

3.6.4.3.2 Moinho de bolas

Este método foi utilizado para a ruptura das células de levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894.

Após descongelar as amostras adiciona-se a um tubo um determinado volume de tampão fosfato de sódio pH 7.8, 50 mM, 0.1 mM de EDTA de forma a que a concentração final de células não seja inferior a 8 g $\cdot\text{L}^{-1}$ e que o volume final seja de 4 ml (no máximo). Adiciona-se 4 mL de esferas de vidro (diâmetro médio igual a 0.5 μm). Coloca-se gelo na câmara do moinho de bolas (Edmund Bühler, Vibrogen V14), coloca-se o tubo (apropriado ao moinho de bolas) e deixa-se a agitar durante 15 min, fazendo ciclos de 5 min com intervalos no gelo. As amostras são então centrifugadas durante 15 min a 5000 g a 4 °C. Os sobrenadantes são transferidos para mangas de diálise (1400 de diâmetro de

rejeição) e procede-se à diálise em tampão fosfato de sódio pH 7.8, 50 mM, 0.1 mM de EDTA, durante um período de cerca de 16 horas a 4 °C com agitação.

3.6.4.4 Doseamento da proteína total

A quantificação da proteína solúvel presente nos extractos celulares foi efectuada pelo método desenvolvido por Bradford (1976). Este método baseia-se na propriedade que o corante azul de Coomassie G-250 tem em estabelecer ligações a proteínas pela sua parte cromófora. Ao ligar-se à proteína, o corante muda de vermelho para azul. Assim, as soluções deste corante apresentam um máximo de absorvência a 465 nm e 595 nm, na ausência e na presença, respectivamente, de proteína em solução.

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em adicionar a 100 µL de amostra, 5 mL de reagente de Bradford. Após mistura no vortex e decorridos 20 min da adição de reagente, lê-se a absorvência a 595 nm (espectrofotómetro 785 da Jasco). O branco obtém-se pela substituição da amostra pelo tampão (o mesmo usado na preparação dos extractos celulares), seguindo o mesmo procedimento utilizado na amostra. Esta análise foi também executada em microplaca para leitura da absorvência num espectrofotómetro ELISA (Rainbow, Tecan), utilizando-se 10 µL de amostra e 300 µL de reagente.

Sempre que se mudou de reagente, procedeu-se a nova calibração através da análise de soluções padrão de albumina sérica de bovino (BSA-A7517, Sigma) com concentrações entre 0.05 g · L⁻¹ e 1.0 g · L⁻¹ (Apêndice A).

Preparação do reagente de Bradford

Dissolve-se 100 mg de azul de Coomassie G-250 em 50 mL de etanol absoluto
Adiciona-se 100 mL de ácido fosfórico (85 % (p/p))
Perfaz-se a 1000 mL com água destilada

3.6.4.5 Actividade da superóxido dismutase

Em todos os métodos de quantificação da superóxido dismutase utiliza-se um gerador de radicais de oxigénio e um detector de radicais de oxigénio. No presente caso recorreu-se ao método enzimático de McCord e Fridovich (1969). Este método baseia-se na transferência de electrões de xantina para o citocromo c (detector) através do oxigénio (gerador de radicais de oxigénio), pela acção da xantina oxidase. A velocidade de redução do citocromo é medida pelo aumento da absorvência a 550 nm por unidade de tempo. Esta reacção é inibida pela superóxido dismutase de acordo com a Figura 3.10.

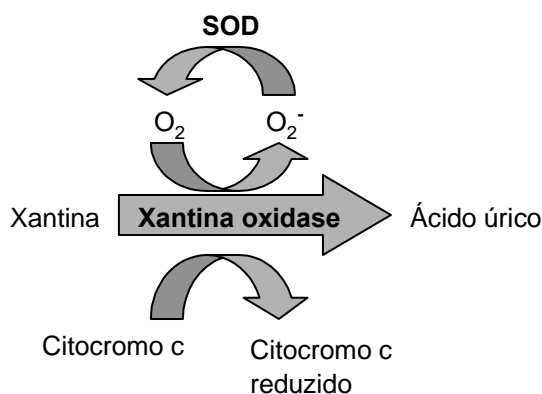


Figura 3.10 Representação esquemática do sistema reaccional utilizado para analisar a actividade da SOD.

Trata-se de um método indirecto de análise uma vez que se baseia na capacidade de remoção de O_2^- da mistura de reacção, medindo-se a quantidade de SOD presente pelo grau de inibição da reacção entre a xantina e o citocromo c. Assim, define-se uma unidade de actividade (1 U) para a SOD como sendo a quantidade de enzima que inibe em 50 % a velocidade de redução do citocromo c no sistema reaccional a pH 7.8 e 25 °C, num volume de reacção igual a 3 mL.

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em adicionar a um tubo espectrofotométrico de 3 mL, 2.9 mL de solução A, mantida a 25 °C, 50 μ L de amostra e 50 μ L de enzima xantina oxidase, 0.2 U mL⁻¹ com 0.1 mM de EDTA,

mantida a 4 °C. Depois de agitar, lê-se a absorvência a 550 nm de 10 s em 10 s durante 1 min. De seguida adiciona-se 10 µL de KCN, 600 µM, volta-se a agitar e lê-se a absorvência a 550 nm durante 1 min com intervalos de 10 s. O KCN inibe a actividade da superóxido dismutase citosólica, deste modo é possível calcular a superóxido dismutase mitocondrial. O aumento da absorvência é monitorizado por um espectrofotómetro 785 (Jasco), acoplado a um computador pessoal com um programa de aquisição e controlo (Jasco, versão 2.6c, Prati Electrónica, Gussago), que permite o registo de cinéticas de reacções.

O branco é determinado substituindo a amostra por tampão e a variação das unidades de absorvência por minuto obtida deve ser próxima de 0.025. Caso contrário, o volume de enzima xantina oxidase deve ser ajustado.

Preparação da Solução A

Dissolver 1.52 mg de xantina (Sigma) em 20 mL de NaOH, 1 mM
Adicionar 49.6 mg de citocromo c
Perfazer a 200 mL com tampão fosfato de sódio pH 7.8, 50 mM com 1 mM de EDTA

A actividade da SOD total e da SOD mitocondrial por mililitro de amostra para cada doseamento é calculada através da fórmula da equação 3.22. No cálculo da actividade da SOD citosólica (Cu,Zn-SOD) por mililitro de amostra é determinada pela diferença entre a SOD total e a SOD mitocondrial.

$$SOD (U / mL) = \left(\frac{\Delta A_B}{\Delta A} \right) \times \frac{1000}{V_a} \quad (3.22)$$

Em que,

ΔA_B é o valor da diferença de absorvência obtido para o branco

ΔA é o valor da diferença de absorvência obtido para a amostra

V_a é o volume de amostra utilizado (50 µL)

3.6.4.6 Actividade da glutathiona reductase

A glutathiona reductase (GR) é uma enzima que é NADPH-dependente e catalisa a reacção da redução da glutathiona oxidada (GSSG), conforme se esquematiza na Figura 3.11.

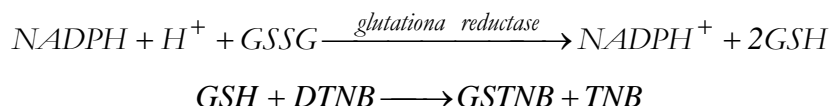


Figura 3.11 Representação esquemática da reacção catalisada pela glutathiona reductase e da reacção com o DTNB.

Este método baseia-se no aumento da absorvência a 412 nm quando o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) é reduzido a TNB pela glutathiona reduzida (GSH), que, por sua vez, é produzida pela glutathiona reductase (Smith *et al.*, 1988). A especificidade do reagente DTNB permite dosear a GR na presença de outras enzimas que são também DAPH-dependentes. Ao contrário de outros métodos que em vez de DTNB utilizam a oxidação do NADPH, necessitando da enzima purificada para o seu doseamento.

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em adicionar a um tubo espectrofotométrico de 3 mL 1 mL de tampão fosfato de potássio 0.2 M pH 7.5, com 1 mM de EDTA, 500 µL de DTNB, 250 µL de água destilada, 100 µL de NADPH, 50 µL de amostra e 50 µL de GSSG. Depois de agitar o tubo segue-se a cinética da reacção durante 2 min com intervalos de 10 s a um comprimento de onda de 412 nm. O aumento da absorvência é monitorizado por um espectrofotómetro 785 (Jasco, Japão), acoplado a um computador pessoal com um programa de aquisição e controlo (Jasco, versão 2.6c, Prati Electrónica, Gussago, Itália), que permite o registo de cinéticas de reacções. O Branco é determinado substituindo a amostra por tampão.

Reagentes

Tampão fosfato de potássio 0.2 M pH 7.5, com 1 mM de EDTA
 DTNB 3 mM em tampão fosfato de potássio 0.01 M pH 7.5
 NADPH 2 mM em tampão fosfato de potássio 0.01 M pH 7.5 (mantido a 4 °C)
 GSSG 20 mM em tampão fosfato de potássio 0.01 M pH 7.5 (mantido a 4 °C)

Define-se uma unidade de actividade (1 U) para a GR como sendo a quantidade de enzima catalisa 1 μmol de DTNB por minuto, a pH 7.5 e 25 °C, num volume de reacção igual a 3 mL.

3.6.4.7 Actividade da catalase

A decomposição do peróxido de hidrogénio é catalisada pela enzima catalase, segundo a reacção representada na equação 3.23.



O doseamento espectrofotométrico da actividade da catalase é efectuado pela medida directa da velocidade de desaparecimento do substrato, de acordo com o método de Beers e Sizer (1952). O desaparecimento de H_2O_2 é seguido pelo decréscimo da absorvência a 240 nm da mistura reaccional. Define-se uma unidade de actividade (1 U) de catalase como a quantidade de enzima que decompõe 1 μmol de H_2O_2 por minuto, a pH 7.0 e 25 °C.

Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste em adicionar a um tubo espectrofotométrico de quartzo de 1 mL, 666.7 μL de tampão fosfato 50 mM, pH 7.0, 333.3 μL de solução de peróxido de hidrogénio, 30 mM e 25 μL de amostra. Após agitar o tubo segue-se a variação da absorvência a 240 nm durante 1 min, registando-se os valores de 5 s em 5 s. O Branco é determinado com tampão.

A actividade da catalase é determinada recorrendo à fórmula da seguinte equação:

$$Catalase(U \cdot mL^{-1}) = \frac{0.693}{t_{1/2}} \frac{V_t}{V_a} \quad (3.24)$$

Em que,

V_t é o volume total da mistura reaccional

V_a é o volume de amostra

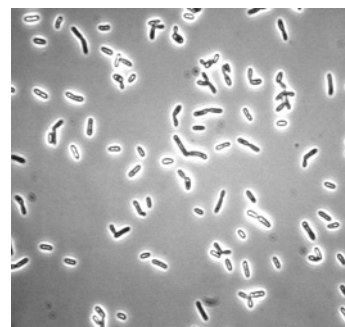
$t_{1/2}$ é determinado através da representação de $\log_{10}(A_{240})$ em função do tempo

Capítulo 4

Efeito da Pressão no metabolismo de duas estirpes de *Kluyveromyces marxianus*

“For many years, pressure was disregarded by biochemists. There was an absence of general idea of what pressure could add to understanding of the behaviour of biomolecules. The situation is now different. There is a growing interest on the part of researchers to introduce pressure as a variable acting on biosystems.”

HAYASHI E BALNY, 1996



Capítulo 4

Efeito da Pressão no metabolismo de duas estirpes de *Kluyveromyces marxianus*

Sumário

Nos meios de cultura industriais tais como, o melaço, o soro de leite e o mosto de cerveja, a fonte de carbono predominante são os dissacarídeos, sacarose, lactose e maltose, respectivamente. Quando se utilizam dissacarídeos como fonte de carbono para o cultivo de leveduras que são fermentativas facultativas, a limitação de oxigénio nem sempre resulta na fermentação alcoólica. Muitas espécies de leveduras que são fermentativas facultativas exibem o efeito de *Kluyver*, isto é, em condições de limitação de oxigénio, estas leveduras não são capazes de fermentar os dissacarídeos.

Neste capítulo, pretendeu-se estudar o efeito do aumento da pressão de ar no comportamento metabólico de duas estirpes de leveduras *Kluyveromyces marxianus*, uma *Kluyver* positiva (*Kluyveromyces marxianus* CBS 7894), a outra *Kluyver* negativa (*Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022). Simultaneamente, tentou-se otimizar o rendimento em biomassa, diminuindo o rendimento em etanol da estirpe *Kluyver* positiva, sem no entanto causar danos celulares pelo excesso de oxigénio introduzido no meio de cultura através do aumento da pressão total de ar.

Em biorreactor pressurizado com apenas 2 bar de pressão de ar, foi possível observar um aumento do rendimento em biomassa da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022 de cerca de 3 vezes em relação ao ensaio realizado com micro-arejamento. Aumentando ainda mais a pressão, até 6 bar, verificou-se um aumento na metabolização do etanol pelas células de levedura. Os resultados obtidos para a levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 confirmaram, mais uma vez, que é possível aplicar o ar hiperbárico até 6 bar de ar como forma de melhorar a transferência de oxigénio no biorreactor, sem causar danos às células. No entanto, também se verificou que o comportamento das células depende fortemente da concentração de lactose no início da operação. A produtividade específica máxima de β -galactosidase foi obtida para a pressão de 6 bar de ar.

4.1 Introdução	110
4.2 Material e Métodos	117
4.3 Resultados e discussão	122
4.4 Conclusões	145

4.1 Introdução

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é um microrganismo de grande importância industrial, não só devido às suas aplicações tradicionais (produção de biomassa e enzimas), mas também como potencial hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas (Kiers *et al.*, 1998). Este microrganismo possui algumas propriedades que o tornam bastante atractivo para a sua aplicação industrial, pois trata-se de um microrganismo seguro, do ponto de vista da segurança alimentar e saúde pública, *status* para a produção de β -galactosidase, é considerado geneticamente acessível e o processo do seu cultivo à escala industrial é eficiente (Kiers *et al.*, 1998).

O crescimento de microrganismos nos efluentes lácticos têm sido alvo de grande atenção devido à possibilidade de produzir proteína microbiana para a alimentação e simultaneamente tratar os efluentes deste tipo de indústria (Krzystek e Ledakowicz, 2000; Grba *et al.*, 2002). Os factores económicos inerentes à produção de biomassa a partir deste tipo de efluentes dependem de diversos factores os quais estão relacionados com a fisiologia celular, nomeadamente com a necessidade em oxigénio e substrato. Estes últimos são alguns dos parâmetros básicos a ter em consideração quando se está a estudar um processo com o objectivo de optimizar o rendimento em biomassa, (Krzystek e Ledakowicz, 2000).

4.1.1 A taxonomia da levedura *Kluyveromyces marxianus*

Quando esta levedura foi isolada, em 1909, foi incluída no género *Saccharomyces*, devido ao facto de ser uma levedura fermentativa, gemulante, que não forma película em meio líquido. O género *Kluyveromyces*, foi só estabelecido em 1965 por van der Walt, e definido para todas as leveduras fermentativas, gemulantes, que formam ascos grandes e multi-esporulados,

contendo esporos que podem ser alongados ou podem ser reniformes. A levedura *Kluyveromyces marxianus* possui 90 % a 100 % de complementaridade do ADN da levedura *Kluyveromyces fragilis*. Segundo Phaff (1985) e Belem e Lee (1998a), a diferença entre estas espécies está na capacidade que a levedura *Kluyveromyces marxianus* tem, de crescer numa ampla gama de temperaturas. Devido ao facto de se encontrar em diversos produtos lácteos, tal como o iogurte, queijo, leite, etc, esta levedura tem a capacidade de assimilar a lactose (Valderrama *et al.*, 1999). Embora algumas estirpes de *Kluyveromyces marxianus* não se encontrem neste tipo de produtos, são igualmente capazes de metabolizar a lactose (Phaff, 1985).

4.1.2 Propriedades morfológicas e fisiológicas

As células da espécie *Kluyveromyces* encontram-se individualizadas, aos pares ou em pequenas cadeias, podendo ocorrer o desenvolvimento de um pseudo-micélio. Têm a forma elipsoidal e cilíndrica, com dimensões de aproximadamente, 2 µm a 5 µm por 3 µm a 13 µm. O crescimento em agar normalmente resulta na formação abundante de pseudo-micélio, especialmente em condições de anaerobiose. Os ascosporos formam-se directamente nas células diploides ou após conjugação de duas células haploides. Esta levedura fermenta diversos açúcares, como a glucose, sacarose, maltose, lactose, rafinose entre outros (Phaff, 1985).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é considerada *Crabtree*-negativa, isto é, quando exposta a condições aeróbias, não fermenta o açúcar quando este se encontra em excesso. No entanto, por vezes podem ocorrer desregulações no metabolismo e este efeito já não ocorre. Por exemplo, em culturas de *Kluyveromyces marxianus* de alta densidade celular ocorre fermentação alcoólica em condições aeróbias, quando o açúcar se encontra em excesso (van Dijken *et al.*, 1993).

Quando se utilizam dissacarídeos como fonte de carbono no cultivo de leveduras fermentativas, a limitação de oxigénio não permite a ocorrência de fermentação alcoólica. De facto, Kluyver e Custers (1940) notaram que algumas leveduras não fermentavam determinados dissacarídeos, embora as hexoses fossem rapidamente fermentadas. Este fenómeno, que é vulgar ocorrer em leveduras fermentativas facultativas com uma variada gama de dissacarídeos é designado de efeito de *Kluyver*. Na levedura *Kluyveromyces marxianus*, a ocorrência deste efeito para com a lactose é dependente do tipo de estirpe (Castrillo *et al.*, 1996).

4.1.3 O efeito de *Kluyver*

O mecanismo que origina o efeito de *Kluyver* tem sido objecto de diversos estudos (Sims e Barnett, 1991; Weusthuis, 1994; Castrillo *et al.*, 1996). Segundo Sims e Barnett (1991) o facto de certas espécies de leveduras exibirem o efeito de *Kluyver* será devido à baixa actividade de certas enzimas como a piruvato descarboxilase ou a álcool desidrogenase. No entanto, no trabalho desenvolvido por Weusthuis (1994) com a levedura *Candida utilis*, *Kluyver* positiva para a maltose, os resultados indicaram que o metabolismo da maltose seria regulado não pelas enzimas fermentativas, piruvato descarboxilase ou álcool desidrogenase (presentes em grande quantidade), mas pelo transporte e pela hidrólise do substrato, ou ainda pela glicólise. De facto, este autor concluiu que a absorção e a hidrólise da maltose era estequiometricamente equilibrada com a quantidade de dissacarídeo, que poderia ser respirado. Este mecanismo que adapta o transporte e a hidrólise do dissacarídeo em resposta à concentração de oxigénio ou ao potencial redox, poderá explicar este fenómeno.

Este autor aprofundou ainda o estudo deste efeito, sendo outra questão levantada pelo mesmo, a de saber se o efeito de *Kluyver* será também resultado da inibição causada pelos produtos resultantes da fermentação. De facto, quando, a uma cultura em crescimento com maltose, era adicionada glucose, a produção de

etanol era praticamente instantânea, indicando a presença das enzimas necessárias à fermentação alcoólica. No entanto, o metabolismo respiratório da maltose era automaticamente inibido pela presença da glucose.

Concluindo então que o aumento de produtos resultantes da fermentação, até níveis críticos, poderá resultar na inibição da utilização do dissacarídeo (Figura 4.1). A inibição do transporte do dissacarídeo poderá ser aliviada através do consumo do metabolito causador desta inibição. Este mecanismo equilibra a taxa do transporte do dissacarídeo a um valor que é suficientemente baixo para que não haja a ocorrência da fermentação alcoólica.

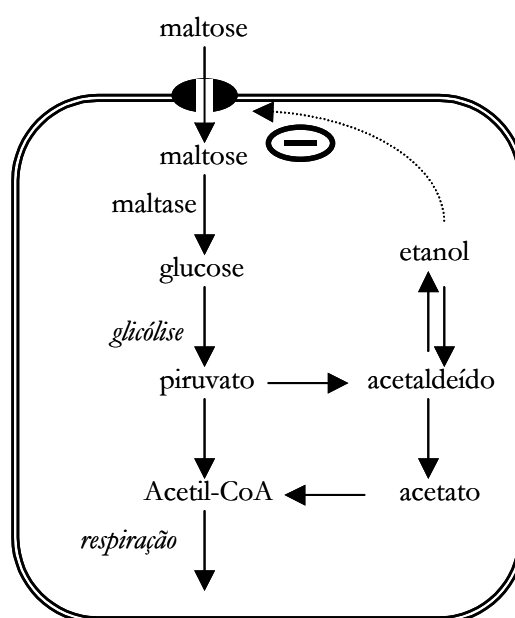


Figura 4.1 Inibição da utilização do dissacarídeo (por exemplo, através do transporte do açúcar) como possível causa de ocorrência do efeito de *Kluyver* nas leveduras (Weusthuis, 1994).

4.1.4 O metabolismo da lactose

A lactose, 4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucose, é um dissacarídeo composto por uma molécula de galactose e outra molécula de glucose, é o açúcar presente em maior quantidade no leite e é obtido a partir do soro de leite como um subproduto da indústria de produção de queijo. Embora uma parte deste sub-

produto seja reaproveitado para a indústria alimentar (levedura e ração), a maior parte é rejeitado sob a forma de efluente. Este efluente é altamente poluente para o meio ambiente, devido à sua elevada carga em CBO e o seu tratamento é altamente dispendioso (Castillo, 1990; Choi e Rhee, 1999). O soro e a lactose podem também ser utilizados directamente como substratos para o crescimento de leveduras, para a obtenção de produtos como proteína microbiana (Revillion *et al.*, 2003), enzimas, etanol (Domingues, 2001) e gorduras (Castillo, 1990).

O metabolismo da lactose exige a combinação activa entre o transporte deste açúcar e a enzima β -galactosidase. A lactose é transportada através da membrana por uma permease que pode ser induzida pela lactose ou pela galactose (Figura 4.2).

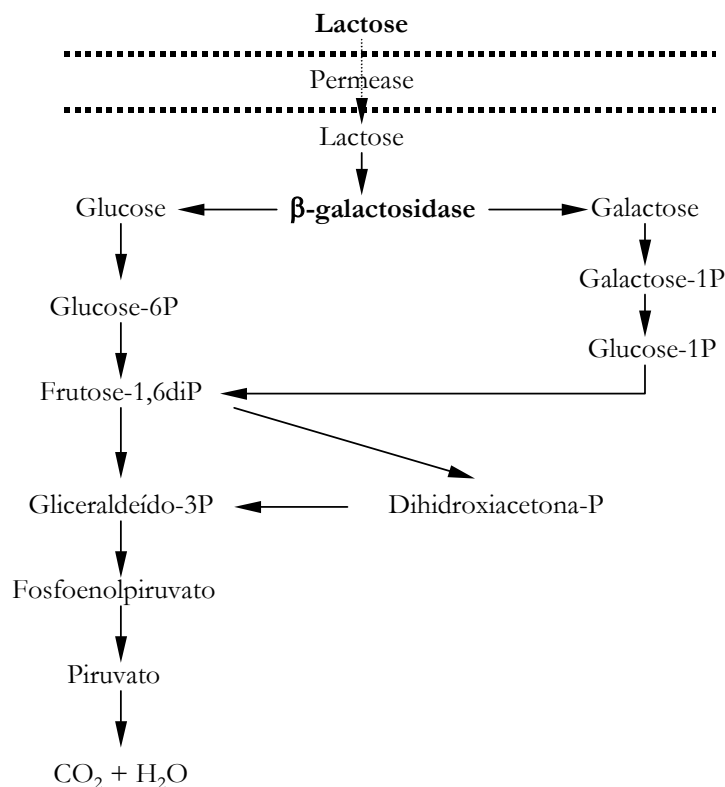


Figura 4.2 O metabolismo da lactose na levedura *Kluveromyces marxianus*.

Após entrar na célula, a lactose é hidrolisada pela β -galactosidase e os produtos desta hidrólise são encaminhados para a glicólise (Boze *et al.*, 1992).

4.1.4.1 A enzima β -galactosidase

As lactases hidrolisam a lactose e outros β -galactósidos tal como o o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (OPNG). Durante a hidrólise da lactose, estas enzimas também possuem actividade de transgalactosidação, produzindo vários oligossacarídeos diferentes que correspondem a 10 % da lactose original (Castillo, 1990). A enzima β -galactosidase pode ser encontrada na natureza e é produzida por animais, plantas e microrganismos (bactérias, fungos e leveduras). De acordo com a sua origem, as suas propriedades são bastante diferentes. No entanto, os microrganismos como as leveduras do género *Kluyveromyces* (Ranzi, *et al.*, 1987) e o fungo *Aspergillus niger* oferecem elevadas produtividades desta enzima, tornando-se, deste modo, bastante atractivos do ponto de vista biotecnológico (Cavaille e Combes, 1995).

As lactases podem ser utilizadas para hidrolisar o leite e alguns dos seus produtos, como é o caso do soro de leite, para prevenir a cristalização da lactose, que causa problemas de textura ou de depósito (Cavaille e Combes, 1998), e também para reduzir ou até eliminar os problemas associados com a intolerância de adultos e crianças à lactose (Rajoka *et al.*, 2003).

Devido à sua vasta aplicabilidade, a enzima β -galactosidase tem sido alvo de diversos trabalhos de investigação, na sua grande maioria sobre a estabilidade térmica, a resistência à pressão hidrostática (Athès e Combes, 1998; Cavaille e Combes, 1998), processos de purificação e de extracção (Dickson e Martin, 1980) e optimização da sua produção (García-Garibay *et al.*, 1987; Inchaurrondo *et al.*, 1994; Barberis e Gentina, 1998; Inchaurrondo *et al.*, 1998; Rajoka *et al.*, 2003).

4.1.5 Aplicações industriais

A levedura *Kluyveromyces marxianus* tem grande aplicabilidade industrial e o facto de apresentar elevadas taxas de crescimento, torna-a economicamente atractiva. O facto de ser aceite como um microrganismo seguro do ponto de vista alimentar e farmacêutico é também, uma mais valia. Outra vantagem é a elevada actividade em β -galactosidade que possui em relação a outras espécies (Belem e Lee, 1998a). Belem e Lee (1998b) referem ainda a possibilidade de utilizar esta levedura para a produção de bioingredientes com elevado valor acrescentado, nomeadamente com benefícios para a saúde.

São vários os estudos efectuados na selecção da estirpe de *Kluyveromyces marxianus* que apresenta maiores valores de produtividade em etanol e biomassa quando crescida em soro lácteo (leite ou queijo) (González Siso *et al.*, 1996; Grba *et al.*, 2002; Kiers, *et al.*, 1998). Lukondeh *et al.* (2003) extraíram das paredes desta levedura, uma manoprotéina com propriedades emulsionantes, com potencial utilização na indústria alimentar, quando crescida, também, em soro lácteo.

As espécies de *Kluyveromyces* que fermentam rapidamente a lactose, como por exemplo a levedura *Kluyveromyces marxianus*, são utilizadas para a produção de combustível de etanol (Phaff, 1985; Bothast *et al.*, 1986; Hack e Marchant, 1995). Outras espécies são seleccionadas para a produção de lactases, como a β -galactosidase, as quais têm grande aplicabilidade na indústria alimentar. Algumas espécies de *Kluyveromyces* têm também a capacidade de fermentar inulina (Phaff, 1985). Outra possível aplicação desta levedura é na produção de leite fermentado *Kefir* contendo bifidobactérias, uma vez que a levedura *Kluyveromyces marxianus* prolonga a sobrevivência destas bactérias, que são benéficas à saúde (Rada, 1997).

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Microrganismo e manutenção

Nestes ensaios foram utilizadas duas estirpes de *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: uma *Kluyver* negativa (K⁻), ATCC 10022 e outra *Kluyver* positiva (K⁺), CBS 7894. Isto é, a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022 fermenta a glucose e a lactose em condições de aerobiose enquanto que, a *Kluyver* positiva, fermenta a glucose mas não fermenta dissacarídeos como a lactose. A presença do efeito de *Kluyver* para alguns dissacarídeos das leveduras *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022 e CBS 7894 foi estudado por Castrillo *et al.* (1996).

A estirpe foi mantida a -80 °C, em tubos criogénicos específicos (Microbank, Pro-Lab Diagnostics). A reactivação das células foi feita em meio sólido, com composição semelhante à do meio líquido acrescentando-se 20 g·L⁻¹ de agar para solidificar o meio, em caixa de Petri. As colónias obtidas após incubação a 30 °C durante 48 horas foram utilizadas para repicar tubos de agar inclinado. Estes foram mantidos no frigorífico a 4 °C.

4.2.2 Meios e condições de cultura

Para obter o inóculo de cada ensaio utilizaram-se tubos inclinados para inocular meio de cultura em matraz. A cultura de inóculo obtida foi incubada a 30 °C e a 150 rpm durante cerca de 16 h.

O meio de cultura semi-sintético utilizado tinha a composição apresentada na Tabela 4.1. Todos os constituintes do meio de cultura foram dissolvidos em tampão fosfato de potássio, 0.2 M pH 5.5. O pH foi ajustado a 5.5 antes da esterilização em autoclave a 121 °C. Ao meio utilizado na cultura em biorreactor foram adicionadas 3 gotas de agente anti-espuma de silicone (Merk 7743).

Tabela 4.1 Composição do meio de cultura das estirpes de levedura *Kluyveromyces marxianus*

Composto	Marca	(g·L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	BDH	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck	1.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	0.4
Extracto de levedura	Merck	1.0
Lactose	Merck	Variável*

* De 10 g·L⁻¹ a 100 g·L⁻¹ conforme o ensaio

Preparação do tampão fosfato de potássio, 0.2 M, pH 5.5

Dissolve-se 13.6 g de KH₂PO₄ com 36 mL de NaOH, 0.2 M
Perfaz-se a 1000 mL com água destilada
Ajusta-se a pH 5.5

4.2.3 Condições de operação

Todos os ensaios deste capítulo, com pressão superior à atmosférica, foram realizados no biorreactor Whitey de 0.3 L, em cultura descontínua. Em simultâneo com os ensaios no biorreactor de pressão também se realizaram ensaios controlo em matraz, designados de *micro-arejamento*. Foram também realizados ensaios num matraz à pressão atmosférica com arejamento e agitação, os quais foram designados de *arejamento*.

As condições de operação utilizadas mantiveram-se constantes em todos os ensaios à excepção da concentração de substrato, lactose, e da pressão de gás, para ambas as estirpes estudadas.

4.2.3.1 Ensaios em descontínuo com a estirpe *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022

Os ensaios em descontínuo foram realizados após o carregamento do reactor com 150 mL de meio previamente inoculado com 15 mL de cultura com

16 horas de crescimento. O meio de cultura do inóculo continha $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose e foi inoculado com células de levedura provenientes de 2 tubos inclinados. Fixaram-se as condições de operação, como a pressão de ar e o caudal de arejamento, que variaram com o ensaio (Tabela 4.2), a temperatura, 30°C , e a agitação, 150 rpm. Cada ensaio decorreu até ser atingida a fase estacionária variando de 48 h a 100 h.

Os ensaios com micro-arejamento foram realizados com as mesmas condições operacionais às dos ensaios com pressão, à excepção da taxa de arejamento e do tipo de agitação. A agitação do matraz é do tipo orbital, enquanto que no biorreactor a agitação é do tipo axial.

Tabela 4.2 Condições de operação nos ensaios efectuados em descontínuo com a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022

Pressão (bar)	Caudal de arejamento ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	Lactose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Micro-arejamento	-	20; 40; 100
2.0	0.15	20; 40; 100
4.0	0.15	20; 40
6.0	0.15	20; 40; 100

4.2.3.2 Ensaio em descontínuo com a estirpe *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894

O procedimento para os ensaios em descontínuo no biorreactor de pressão é semelhante ao que está descrito no ponto 4.2.3.1. No entanto, com esta estirpe, foram também realizados ensaios com misturas enriquecidas com dióxido de carbono relativamente ao ar, o que permitiu analisar também os efeitos da pressão parcial de dióxido de carbono no comportamento fisiológico da célula. As condições operacionais estão resumidas na Tabela 4.3.

Os ensaios, designados de *arejamento*, foram realizados também em descontínuo em matraz de 0.25 L de capacidade máxima e com um volume de meio de 0.15 L. Os ensaios decorriam à pressão atmosférica e o ar era introduzido no meio de cultura a um caudal de 0.15 L·min⁻¹ (PTN). O controlo do caudal de arejamento era realizado manualmente por regulação da válvula acoplada ao rotâmetro de entrada de ar. O ar atravessa um filtro (ampola de algodão) de modo a remover partículas e microrganismos. Este sistema possui um agitador com um impulsor tipo turbina para promover a agitação. O arejamento é efectuado por um arejador modelo Tagus 2000. As condições de operação dos ensaios estão descritas na Tabela 4.3, uma vez que este sistema foi utilizado apenas com a levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894.

Os ensaios com micro-arejamento foram realizados com condições operacionais idênticas às dos ensaios com pressão, à excepção do arejamento e do tipo de agitação (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Condições de operação nos ensaios efectuados em descontínuo com a levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894

Gás	Pressão (bar)	Velocidade de agitação (rpm)	Caudal de arejamento (L·min ⁻¹)	Lactose (g·L ⁻¹)
	Micro-arejamento	150	-	10; 40
	Arejamento	330	0.15	10
Ar	2.0	150	0.15	10; 40
	4.0	150	0.15	10; 40
	6.0	150	0.15	10; 40
Mistura	2.0	150	0.15	10
	6.0	150	0.15	10

Mistura – Contém 4% (v/v) de CO₂, 21 % (v/v) de O₂ e 75% (v/v) de N₂

4.2.4 Monitorização

O efeito da taxa de transferência de oxigénio, do caudal de arejamento e da pressão de ar no comportamento celular foi estudado em cada ensaio através da monitorização da variação ao longo do tempo de operação do crescimento celular, viabilidade celular, consumo de lactose, produção de etanol, do conteúdo intracelular em ATP e produção da enzima β -galactosidase. Neste capítulo recorreu-se ao método da coloração com azul de metileno para análise da viabilidade celular. Embora este método não tenha precisão para classificar as células em mortas e vivas, apenas se baseia na sua fragilidade membranar. No entanto, é um método bastante rápido para fazer uma estimativa da viabilidade da cultura.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 A levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é um microrganismo bastante atractivo do ponto de vista científico e industrial, e uma vez que se trata de uma levedura aeróbia, e, industrialmente são atingidas culturas de elevada densidade celular, o oxigénio pode ser um factor limitante do crescimento, quando presente em pequenas concentrações. Segundo Krzystek e Ledakowicz (2000) o crescimento da levedura *Kluyveromyces* está intimamente relacionado com a concentração de oxigénio no meio de crescimento. Como já foi referido anteriormente, através do aumento da pressão de ar é possível aumentar a taxa de transferência de oxigénio para o meio de cultura.

Desta forma, estudou-se o efeito do aumento da pressão de ar, 2 bar, 4 bar e 6 bar, como forma de melhorar a transferência de oxigénio no meio de cultura no crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus*. Simultaneamente, estudou-se o efeito da concentração de substrato, lactose, com uma gama de concentrações de 20 g·L⁻¹, 40 g·L⁻¹ e 100 g·L⁻¹ (Figura 4.3). Como a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022 é *Kluyver* negativa para a lactose, é capaz de fermentar este dissacarídeo em etanol.

O oxigénio dissolvido no meio, pela aplicação do aumento da pressão encontra-se descrito na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Valores da taxa de transferência de oxigénio (OTR) para o Biorreactor Whitey de 0.3 L. Valores médios ± erro padrão

Pressão (bar)	Micro-arejamento	2.0	4.0	6.0
OTR (mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	96 ± 23	365 ± 41	806 ± 89	1099 ± 62

Através da Figura 4.3 é possível observar um comportamento típico de operação em descontínuo.

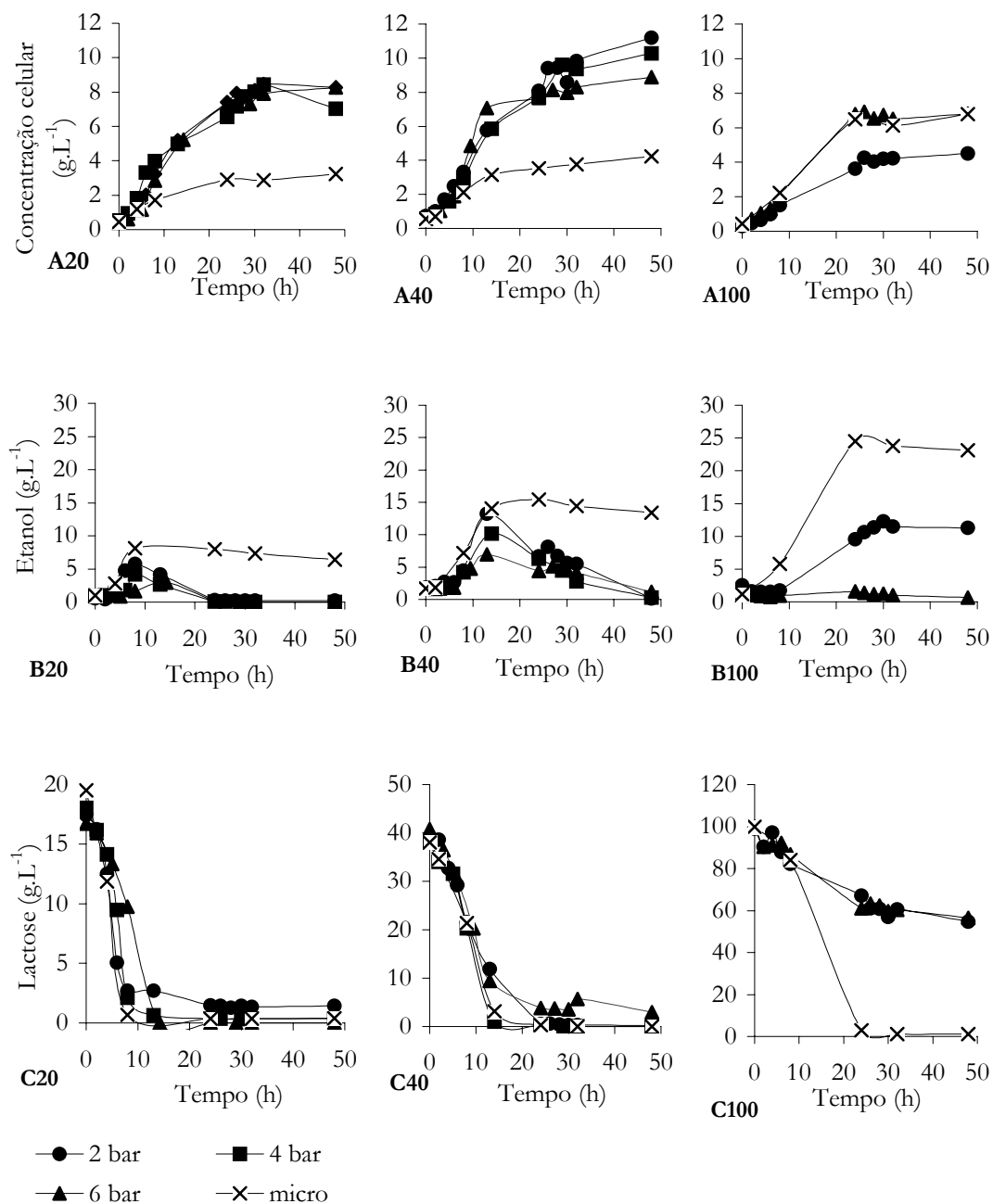


Figura 4.3 Variação da biomassa (A), etanol (B) e lactose (C) ao longo do tempo de fermentação, com 2 bar, 4 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreator Whitey de 0.3 L, com uma concentração inicial de sacarose de 20 g.L⁻¹ (A₂₀, B₂₀ e C₂₀), 40 g.L⁻¹ (A₄₀, B₄₀ e C₄₀) e 100 g.L⁻¹ (A₁₀₀, B₁₀₀ e C₁₀₀).

Para os ensaios com pressão e com menores concentrações de lactose ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) verifica-se que, numa primeira fase as células metabolizam a lactose em biomassa e etanol, e numa segunda fase, o etanol é oxidado pelas células formando biomassa. Nos ensaios com micro-arejamento, a concentração de etanol obtida é bastante superior, assim como a concentração celular formada é muito menor do que o que se obteve nos ensaios realizados no biorreactor hiperbárico. Ainda no ensaio com micro-arejamento, à medida que a concentração inicial de lactose aumenta, aumenta a quantidade de etanol produzida. Este é assimilado muito lentamente pelas células de levedura. No entanto, para $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose o mesmo não acontece, pois, aparentemente, a concentração de etanol obtida inibe o crescimento. Nos ensaios pressurizados e com $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose, após 10 h do arranque dos ensaios, o substrato é totalmente consumido. O mesmo comportamento é verificado quando a concentração de lactose é duplicada para $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ao contrário, aumentando ainda mais a concentração de lactose até perto do limite de dissolução, $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, apenas 40 % do substrato é consumido. No entanto, no ensaio com micro-arejamento a concentração inicialmente presente, $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, é totalmente metabolizada pelas células de levedura.

Os resultados sugerem a existência de um mecanismo celular repressivo do crescimento, o qual poderá estar de alguma forma relacionado com elevadas concentrações de oxigénio, na presença de concentrações elevadas de substrato, uma vez que este comportamento não é verificado em condições de limitação de oxigénio. Os resultados apontam para a existência de um efeito inibidor sinérgico do substrato e da pressão.

À medida que a pressão aumenta, para todas as concentrações de lactose estudadas, verifica-se que a concentração de etanol máxima produzida diminui. Para os ensaios com $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e com $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose inicial, verifica-se que no

final dos ensaios todo o etanol é oxidado, pelo que, não se registam diferenças significativas na biomassa final obtida com o aumento da pressão.

No ensaio realizado com 6 bar de ar e com $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose, a concentração de etanol produzida é praticamente residual e decorridas cerca de 20 h após o arranque do ensaio, o crescimento parece ter cessado, assim como o consumo de substrato. Assim, conclui-se que o aumento da pressão favorece a oxidação do etanol e inibe a sua produção. A inibição da actividade fermentativa aumenta com a pressão.

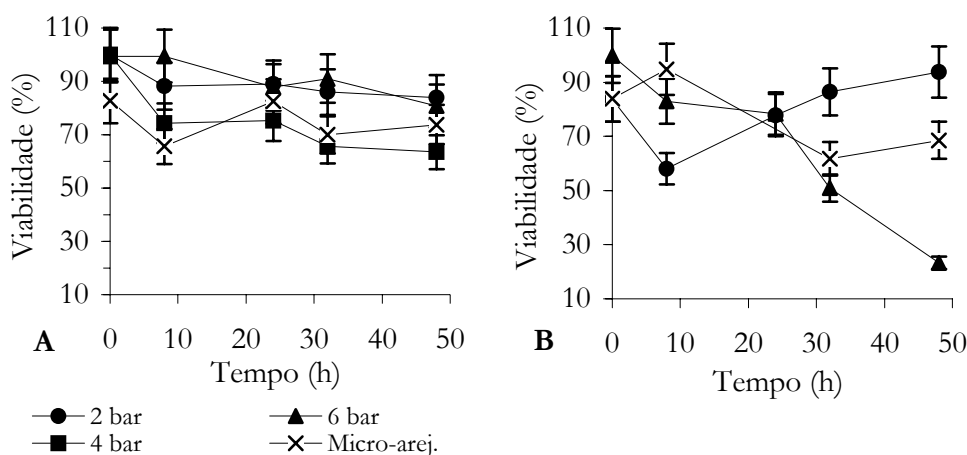


Figura 4.4 Variação da percentagem de viabilidade, ao longo do tempo dos ensaios realizados com uma concentração inicial de lactose de (A) $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de (B) $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ com 2 bar, 4 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreactor Whitey de 0.3 L. São apresentados os valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança.

Através dos resultados obtidos para a viabilidade celular, verifica-se que, para a concentração de lactose de $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, e com 6 bar de ar (Figura 4.4 B), a viabilidade tem um decréscimo bastante acentuado, atingindo, no final do ensaio (48 h), uma viabilidade de 23 %, que é bastante inferior aos outros ensaios, com 2 bar de ar e com micro-arejamento, nos quais mais de 70 % das células ainda estavam viáveis. Ao contrário, com $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, (Figura 4.4 A), a variação da percentagem de viabilidade foi praticamente coincidente para todos os ensaios realizados.

A viabilidade metabólica celular pode ser avaliada pela determinação da quantidade de ATP intracelular. Este parâmetro é importante na análise de fluxos metabólicos (Verduyn *et al.*, 1991). Além disso a estimativa da concentração intracelular de ATP permite inferir o estado de viabilidade das células, já que o ATP é rapidamente consumido assim que as células morrem (Lundin, 1982).

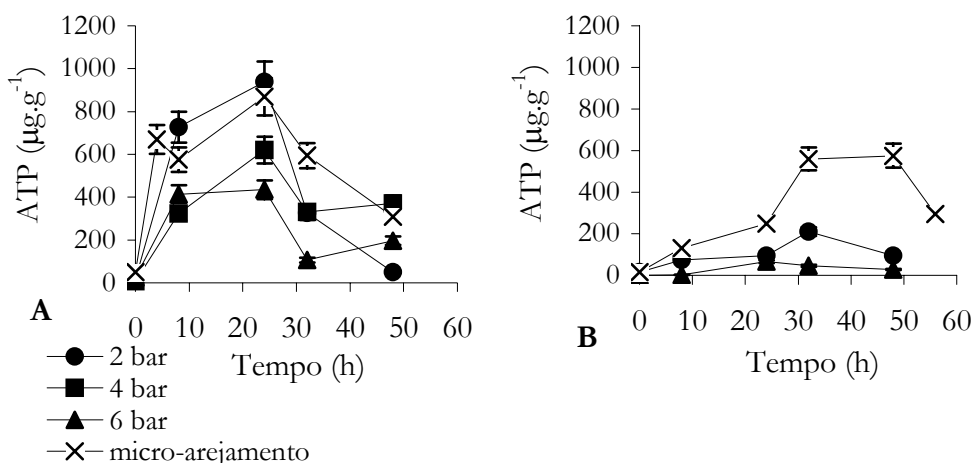


Figura 4.5 Variação da concentração específica de ATP por grama de peso seco, ao longo do tempo dos ensaios realizados com uma concentração inicial de lactose de (A) 20 g·L⁻¹ e de (B) 100 g·L⁻¹ com 2 bar, 4 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreactor Whitey de 0.3 L. São apresentados os valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança.

A concentração de ATP intracelular ao longo do tempo apresenta um comportamento típico de uma cultura em descontínuo (Figura 4.5 A), para todos os ensaios realizados com 20 g·L⁻¹ de lactose. A concentração de ATP intracelular aumenta até cerca das 20 h - 24 h de crescimento. Decorrido este período de tempo de fermentação, a disponibilidade energética da célula começa a diminuir. Esta diminuição é normalmente explicada pelo decréscimo da taxa específica de crescimento, que ocorre por esgotamento do substrato. Os ensaios realizados com pressões de ar de 4 bar e de 6 bar apresentam valores de concentração específica de ATP inferiores aos obtidos no ensaio com 2 bar de ar e com micro-arejamento. A energia disponível poderá estar a ser utilizada para a manutenção celular devido às pressões mais elevadas. Foram obtidos valores de ATP bastante

menores nos ensaios realizados com $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose (Figura 4.5 B). A concentração específica de ATP máxima, aproximadamente $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, nos ensaios com pressão, é bastante inferior às concentrações encontradas nos ensaios realizados com $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose.

O crescimento celular parece não sofrer alterações com o aumento da pressão para concentrações de lactose de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Este facto é confirmado pela taxa específica de crescimento, a qual apresenta valores semelhantes para todas as pressões estudadas (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 Taxa específica de crescimento e produtividade máxima para os ensaios efectuados com a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022, com várias concentrações de lactose e com diferentes condições operacionais: micro-arejamento e pressão de ar

Lactose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Parâmetros	Micro- arejamento	Pressão de ar (bar)		
			2	4	6
20	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.19	0.26	0.25	0.20
	$P \text{ (mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$	90	247	250	234
40	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.12	0.20	0.21	0.22
	$P \text{ (mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$	100	285	275	244
100	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.10	0.20	N.D.	0.18
	$P \text{ (mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$	178	122	N.D.	189

N.D. – não disponível.

Em condições de micro-arejamento, o crescimento celular é mais lento, facto confirmado pelos valores baixos da taxa específica de crescimento.

A produtividade em biomassa (Tabela 4.5) aumenta significativamente quando se passa de condições de limitação de oxigénio (micro-arejamento) para condições de arejamento sob pressão (2 bar). Krzystek e Ledakowicz (2000) verificaram que o aumento da concentração de oxigénio dissolvido de $0.28 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ para $0.32 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ provocou um aumento de 25 % na

produtividade em biomassa da levedura *Kluyveromyces fragilis*. O aumento da pressão de 2 bar para 4 bar e 6 bar de ar não se traduz num acréscimo da produtividade. Com uma concentração de lactose de 100 g·L⁻¹, o aumento da pressão de ar não traz vantagem à cultura, uma vez que não houve aumento da produtividade.

Ao analisar os rendimentos globais em biomassa (Figura 4.6) obtidos para este estudo, mais uma vez se confirma que não há alterações significativas na produção em biomassa, com o aumento da pressão total de ar, pois o respectivo rendimento não sofreu alterações significativas, no caso de 20 g·L⁻¹ e 40 g·L⁻¹ de lactose.

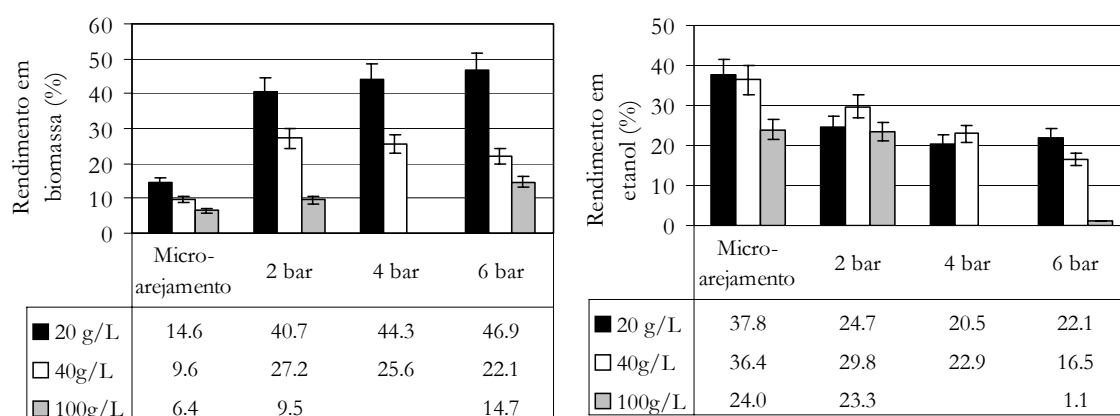


Figura 4.6 Efeito da pressão de ar nos rendimentos globais em biomassa (g·g_{lactose}⁻¹) em etanol (g_{etanol}·g_{lactose}⁻¹), para diferentes concentrações de lactose: 20 g·L⁻¹, 40 g·L⁻¹ e 100 g·L⁻¹. A percentagem de rendimento foi obtida a partir da razão entre a diferença da concentração celular final (máxima) e inicial, e a concentração de lactose correspondente. Valores médios ± erro padrão.

De facto, a variação verificada entre os valores dos rendimentos corresponde a um aumento de cerca de 6 % (de 2 bar para 6 bar), que está dentro do desvio padrão obtido para o cálculo do rendimento global (10 %), não tendo por isso um valor significativo. No entanto, quando se passa de uma condição de limitação de oxigénio (micro-arejamento) para outra de pleno arejamento (pressão) observam-se alterações significativas no metabolismo celular, passando

a predominar o metabolismo oxidativo relativamente ao reductivo. Para concentrações de lactose de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, o aumento da pressão de ar para 2 bar triplicou o rendimento em biomassa. Inclusivamente, no ensaio realizado com $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ o rendimento em biomassa aumenta com a pressão, diminuindo a produção de etanol.

O rendimento em etanol, tal como o rendimento em biomassa, apresenta uma variação bastante acentuada quando se aumenta a pressão para 2 bar de ar. No entanto, para maiores incrementos da pressão o rendimento não parece variar significativamente. A variação mais expressiva verifica-se nos ensaios com $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose nos quais o rendimento diminui até um valor quase nulo, com o aumento da pressão até 6 bar de ar.

Estes ensaios mostraram que esta estirpe de *Kluyveromyces marxianus* não é inibida para pressões de ar até 6 bar de ar. No entanto, a concentração de substrato utilizado é de extrema importância neste tipo de ensaios, pois com uma elevada concentração de lactose ($100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) a estirpe não foi capaz de metabolizar totalmente, ao contrário das concentrações menores, de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Este comportamento poderá estar relacionado com a repressão do crescimento celular pelo excesso de açúcar, o qual é agravado pelo aumento da pressão (Fiechter *et al.*, 1981).

4.3.2 A levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894

Em processos industriais em que o produto de interesse é a biomassa ou um componente intracelular, a ocorrência de fermentação alcoólica é extremamente indesejável. Frequentemente tenta-se recorrer a métodos operacionais para evitar o aparecimento deste sub-produto, como por exemplo operar em semi-contínuo de modo a controlar a concentração de substrato na alimentação e a controlar a taxa específica de crescimento, para evitar a limitação pelo oxigénio. A utilização industrial de leveduras que exibem o efeito de *Kluyver* poderá ser uma forma de

ultrapassar esta limitação. Desta forma, optou-se por estudar uma levedura com interesse industrial que exhibe este efeito para com a lactose, como é o caso da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894.

4.3.2.1 O efeito da pressão de ar no crescimento

Uma vez que se trata de uma levedura que exhibe o efeito *Kluyver* para a lactose, não deverá produzir etanol, isto é, não fermenta na presença deste dissacarídeo. Através da Figura 4.7 B é possível verificar que na presença de lactose, esta estirpe de *Kluyveromyces* não fermenta a lactose, uma vez que não há produção de etanol, nem em condições de micro-arejamento, nem de pressurização com 2 bar de ar. No entanto, quando se utiliza um monossacarídeo (ex.: glucose) como fonte de carbono, o comportamento é completamente diferente do anterior, isto é, há ocorrência de fermentação alcoólica. No ensaio realizado com glucose (Figura 4.7 A), em condições de limitação de oxigénio (micro-arejamento) e arejamento forçado (pressão de ar), as células de levedura produzem etanol.

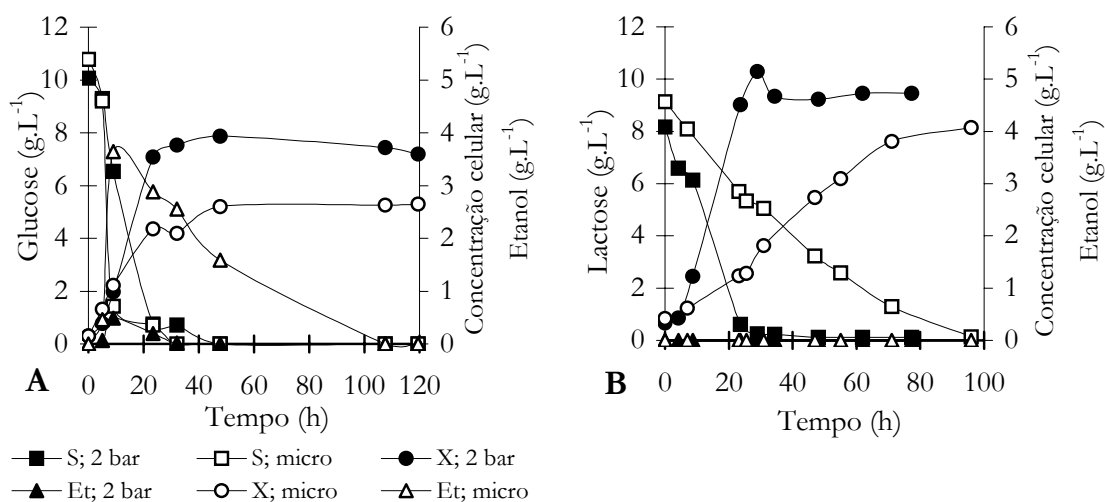


Figura 4.7 Variação da concentração celular (X), etanol (Et), glucose (S) e lactose (S), ao longo do tempo de fermentação. A figura A representa os ensaios realizados com 2 bar de pressão de ar e com micro-arejamento utilizando como fonte de carbono a glucose. A figura B representa os ensaios realizados com 2 bar de pressão de ar e com micro-arejamento utilizando como fonte de carbono a lactose. Os ensaios com 2 bar de pressão foram realizados no biorreactor Whitey de 0.3 L.

Note-se a grande diferença existente entre a concentração celular obtida em ambos os ensaios, cuja concentração máxima é de $2.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, para o ensaio com micro-arejamento e com pressão, respectivamente (Figura 4.7 A).

O aumento da pressão também favoreceu o crescimento celular com lactose como fonte de carbono (Figura 4.7 B). Observou-se uma maior velocidade de crescimento e de consumo de substrato nas células cultivadas a 2 bar relativamente às células em micro-arejamento. A maior disponibilidade de oxigénio no ensaio com pressão permitiu a obtenção de uma concentração final em biomassa mais elevada.

A limitação de oxigénio observada nos ensaios com micro-arejamento foi comprovada pela cultura das células num biorreactor à pressão atmosférica (biorreactor Biolab). Foram estudadas duas velocidades de agitação, 200 rpm e 400 rpm, mantendo as restantes condições idênticas às utilizadas no biorreactor de pressão. Conforme se pode observar na Figura 4.8 B para ambas as condições de agitação, o oxigénio dissolvido no meio caiu a zero a partir das 5 h e 10 h, respectivamente, que é o tempo a partir do qual se inicia a fase exponencial de crescimento.

A diferença entre os ensaios realizados com velocidades de agitação diferentes é também visível, isto é, o consumo de substrato é mais lento (Figura 4.8 A) com uma velocidade de agitação de 200 rpm, na qual a concentração de oxigénio dissolvido anula-se mais cedo. Assim, confirma-se que à pressão atmosférica, existe limitação de oxigénio, apesar do aumento a velocidade de agitação.

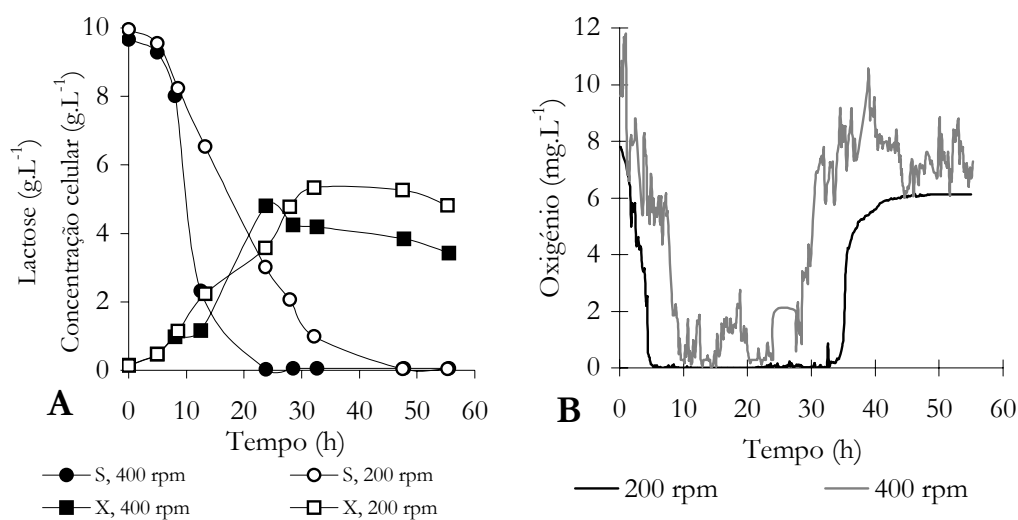


Figura 4.8 Variação da concentração celular, X (A), concentração de lactose, S (A) e concentração de oxigénio dissolvido (B), durante a cultura descontínua no biorreactor Biolab, à pressão atmosférica, a 30 °C, 1.5 L min⁻¹ de caudal de arejamento (1 vvm), para a velocidade de agitação de 200 rpm e 400 rpm.

Para completar o estudo do efeito do aumento da pressão, no crescimento desta estirpe, foram realizados ensaios a pressões de ar até 6 bar, e tal como no sub-capítulo 4.3.1, foram estudadas duas concentrações de lactose, 10 g.L⁻¹ (Figura 4.9) e 40 g.L⁻¹ (Figura 4.10), no biorreactor hiperbárico Whitey de 0.3 L.

Sabe-se que a taxa de transferência de oxigénio aumenta com o aumento da pressão total de ar, mas também com o aumento do caudal de arejamento no meio de cultura à pressão absoluta de 1 bar. Assim, e com o objectivo de comparar duas formas diferentes de aumentar a taxa de transferência de oxigénio, utilizaram-se dois sistemas de reactores, um hiperbárico e outro à pressão atmosférica com arejamento e agitação mecânica, nas mesmas condições operacionais de temperatura, OTR e volume de meio de cultura. Deve-se, no entanto, referir que a geometria e o mecanismo que promove a agitação, dos dois sistemas é diferente. O biorreactor hiperbárico, Whitey, possui agitação axial, a qual é promovida através do sistema mecânico acoplado ao banho

termostatzado, por sua vez, o reactor à pressão atmosférica (matraz, com forma tipo cone) possui um agitador com um impulsor tipo turbina. Sendo este último designado, nas figuras seguintes, por arejamento.

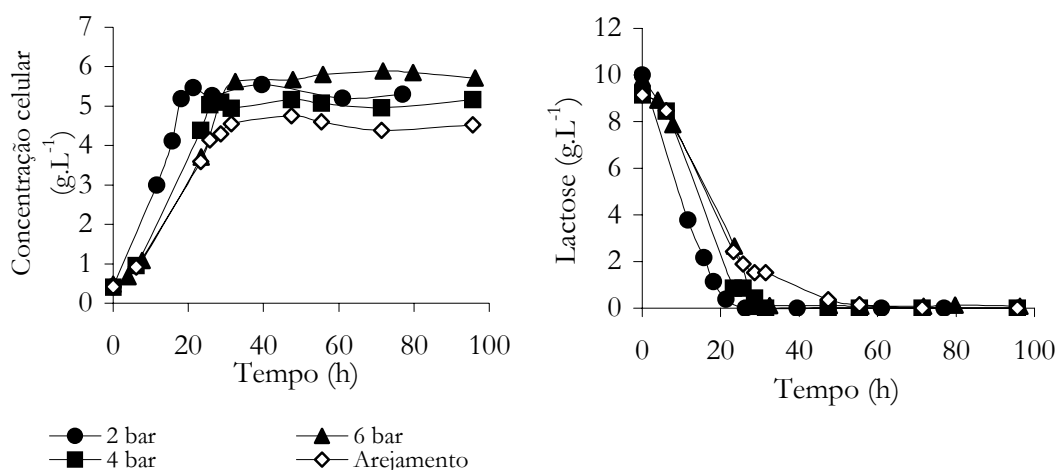


Figura 4.9 Variação da concentração celular e de lactose ao longo do tempo dos ensaios, em descontinuo com uma concentração inicial de lactose de 10 g·L⁻¹, realizados com pressão de ar: 2 bar, 4 bar e 6 bar, e com arejamento.

O aumento da pressão até 6 bar de ar não levou a um aumento significativo da concentração celular em relação ao ensaio realizado com pressão de 2 bar, tal como em relação ao consumo de lactose, o qual foi total após 20 h do início do ensaio, para ambas as experiências (Figura 4.9). No entanto, nota-se um efeito positivo da pressão no crescimento celular e no consumo de substrato quando se compara o ensaio a 2 bar de ar e o ensaio com arejamento à pressão atmosférica. De facto, neste último caso as células apenas consomem totalmente o substrato após 60 h do início do ensaio, e a concentração celular máxima obtida foi ligeiramente menor do que no ensaio a 2 bar de ar, 4.8 g·L⁻¹ e 5.6 g·L⁻¹, respectivamente. Refira-se ainda que as taxas de transferência de oxigénio para o ensaio com arejamento e com 2 bar de ar são muito próximas, 365 mg·L⁻¹·h⁻¹ e 429 mg·L⁻¹·h⁻¹ respectivamente.

O comportamento celular observado para os ensaios com uma concentração inicial de lactose de $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 4.10) foi bastante diferente do descrito anteriormente para os ensaios realizados com $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose. Após decorridas 120 h a lactose não foi totalmente consumida pelas células de levedura. Contrariamente ao que ocorreu no ensaio com 2 bar de ar e com $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose, neste conjunto de ensaios (com $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose) esta condição de pressão é a que menos favorece o crescimento celular, assim como o consumo de substrato, uma vez que este cessa após 40 h. Com um valor maior de pressão, 4 bar, foi possível obter um valor máximo de concentração celular, $13.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ao contrário do que se esperava, o aumento da pressão de 4 bar para 6 bar não favoreceu o crescimento. Os ensaios realizados com pressão de 2 bar de ar, micro-arejamento e arejamento à pressão atmosférica são os que menos favorecem o crescimento celular. As velocidades de consumo de substrato são mais lentas e os resultados sugerem ainda que as taxas de crescimento celular e de consumo de substrato decrescem com o aumento da concentração de substrato de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

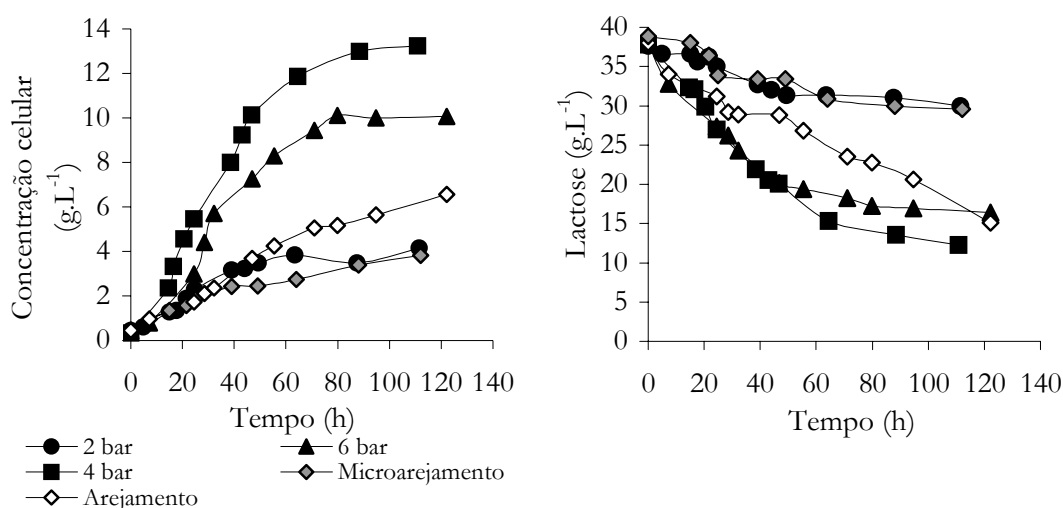


Figura 4.10 Variação da concentração celular e lactose ao longo do tempo dos ensaios, em descontinuo com uma concentração inicial de lactose de $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, realizados com pressão de ar: 2 bar, 4 bar e 6 bar, e com arejamento e micro-arejamento.

Na Figura 4.11 é possível analisar e comparar o efeito da pressão de ar em conjunto com o efeito da concentração de lactose no rendimento em biomassa. Como se trata de uma estirpe que exibe o efeito de *Kluyver* para a lactose, as células desta levedura não fermentaram o açúcar em etanol, sendo o produto principal do metabolismo a biomassa. Assim, e ao contrário do que se verificou para a estirpe *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022, o aumento da pressão de ar de 2 bar para 6 bar não teve uma influência significativa no rendimento global em biomassa. No entanto, foi possível aumentar o rendimento de 40 % (micro-arejamento) para 54 % (6 bar de ar) utilizando o ar hiperbárico. Este resultado permite inferir que o aumento de pressão até 6 bar não inibe o crescimento celular.

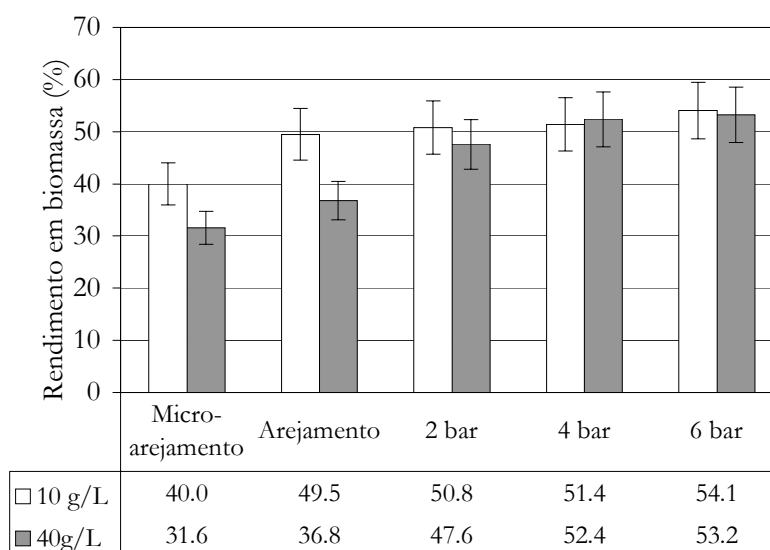


Figura 4.11 Efeito da pressão de ar no rendimento global em biomassa ($\text{g biomassa produzida} \cdot \text{g lactose consumida}^{-1}$) para diferentes concentrações de lactose: $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. O valor de percentagem de rendimento foi obtido a partir da razão entre a diferença da concentração celular final (máxima) e inicial, e a concentração de lactose correspondente. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.

Foi determinada a taxa específica de crescimento das células e a produtividade em biomassa para todos os ensaios (Figura 4.12).

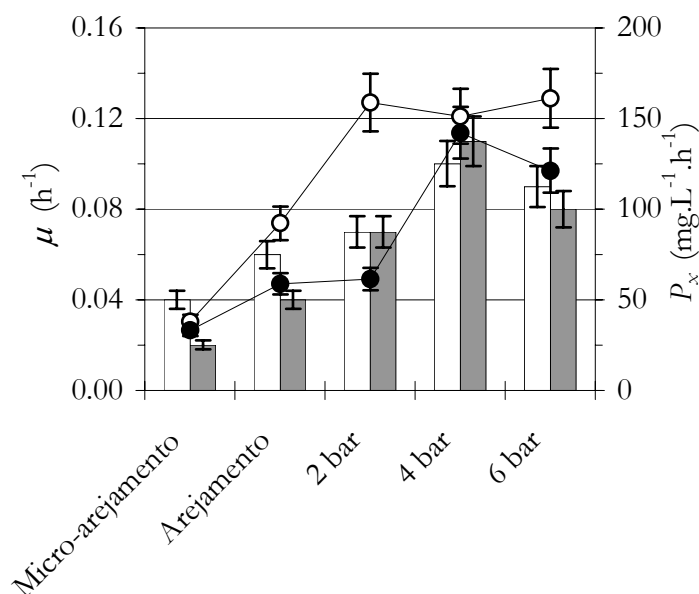


Figura 4.12 Efeito da pressão de ar na taxa específica de crescimento (μ) (barras) e na produtividade em biomassa (P_x) (círculos) para diferentes concentrações de lactose: $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (barra branca e círculo branco) e $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (barra cinzenta e círculo preto). A produtividade foi determinada a partir da concentração máxima obtida em cada ensaio, que era atingida após 32 h e 80 h do arranque dos ensaios, para $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. São apresentados os valores médios \pm erro padrão.

Mais uma vez é possível encontrar diferenças significativas entre o ensaio com limitação de oxigénio (micro-arejamento) e os ensaios com arejamento, à pressão atmosférica e superiores. Isto é, a taxa específica de crescimento aumenta com a pressão, e consequentemente com a taxa de transferência de oxigénio, para ambas as concentrações de lactose estudadas. Os valores mais elevados de μ (0.1 h^{-1}) e de produtividade ($142\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) correspondem à pressão de 4 bar de ar e com $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose. Para a concentração de lactose mais baixa, $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a produtividade aumenta até $159\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e mantém-se mais ou menos constante de 2 bar até 6 bar de ar.

Os resultados confirmam mais uma vez que é possível aplicar o ar hiperbárico até 6 bar de ar, como forma de melhorar a transferência de oxigénio no biorreactor, sem causar inibição do crescimento celular. No entanto, também se

verificou que o comportamento das células depende fortemente da concentração de lactose no início da operação, que poderá estar relacionado com a velocidade de consumo do substrato. Contudo, pode concluir-se, através da análise da produtividade e da taxa específica de crescimento, que o valor de pressão total de ar de 4 bar, correspondendo a uma pressão parcial de oxigénio de 0.84 bar, foi o que mais favoreceu o crescimento, independentemente da concentração de lactose (Figura 4.12).

4.3.2.2 O efeito da pressão parcial de dióxido de carbono no crescimento

Sabe-se que a influência da pressão total no crescimento celular pode ser causado tanto por si só ou pelas respectivas pressões parciais de oxigénio ou de dióxido de carbono (Onken, 1990). Relativamente aos possíveis efeitos que o dióxido de carbono poderá ter em biorreactores industriais, pode fazer-se uma pequena estimativa da pressão parcial máxima e da concentração dissolvida na cultura. Se o ar estiver à pressão de 5 bar, e se a composição de CO₂ for de 0.03 % (v/v), então a pressão parcial de CO₂ será de 1.5 mbar. Com a produção de CO₂ o gás de saída do biorreactor poderá conter 1 % a 3 % de CO₂. Este valor será atingido no topo de biorreactor e, sob uma pressão total de ar de 1.5 bar, a pressão parcial de CO₂ variará entre 15 mbar e 45 mbar. Se se considerar um determinado nível de sobressaturação, a concentração de CO₂ no meio atingirá valores que correspondem à pressão parcial de equilíbrio de cerca de 25 mbar a 75 mbar. Isto quer dizer que parte da cultura celular poderá sofrer os efeitos do dióxido de carbono, dependendo da espécie de microrganismo, do estado da cultura e das condições operacionais. Nos processos de dimensionamento de biorreactores estes efeitos não devem ser negligenciados (Onken e Liefke, 1989).

Foram realizados ensaios com pressões de ar de 2 bar e 6 bar, de misturas enriquecidas em dióxido de carbono, 4 % (v/v), relativamente ao ar (Tabela 4.6). Estes dois ensaios foram comparados com os que tinham sido anteriormente

realizados às mesmas pressões de ar, com uma composição de 0.03% (v/v) de CO_2 . Os objectivos destes ensaios são: 1) dissociar os efeitos da pressão total de ar, do efeito da pressão parcial de dióxido de carbono; 2) uma vez que não é possível analisar o CO_2 no gás à saída do biorreactor e verificar a existência de um possível acréscimo de CO_2 no decorrer dos ensaios, aumenta-se o CO_2 à entrada e estudam-se os efeitos deste gás.

Os resultados obtidos encontram-se representados nos gráficos da Figura 4.13.

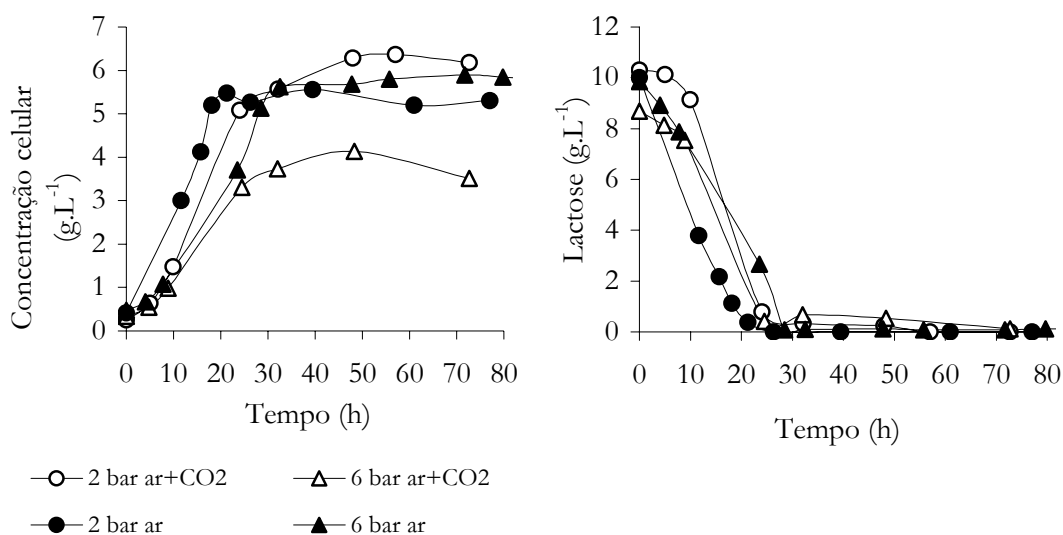


Figura 4.13 Variação da concentração celular e da concentração de lactose ao longo do tempo dos ensaios realizados com diferentes valores de pressão de ar, 2 bar e 6 bar e com a mistura de dióxido de carbono. Todos os ensaios foram realizados com uma concentração inicial de lactose de 10 g.L⁻¹.

Através da análise da figura anterior, verifica-se que não existem diferenças significativas entre os resultados dos ensaios efectuados com 2 bar de ar e com a mistura à mesma pressão. Ou seja, o aumento da pressão parcial de dióxido de carbono de 0.6 mbar (2 bar de ar) para 80 mbar (mistura a 2 bar), não provocou alterações no metabolismo das células de levedura. Da mesma forma, Onken (1990) verificou que a taxa específica de crescimento de células de *Pseudomonas fluorescens* não era afectada com pressões parciais de CO_2 até 40 mbar.

Contrariamente, o aumento da pressão parcial de 1.8 mbar (6 bar de ar) para 280 mbar (mistura a 6 bar), diminuiu a concentração celular máxima obtida (Tabela 4.6), embora a lactose tenha sido quase totalmente consumida ao fim de 30 h.

Tabela 4.6 Caracterização do gás utilizado nos ensaios efectuados e resultados obtidos para a taxa específica de crescimento e concentração celular máxima obtida em cada um dos ensaios

Gás	Pressão total (bar)	p_{O_2} (bar)	p_{CO_2} (mbar)	μ (h ⁻¹)	$x_{m\acute{a}x}$ (g·L ⁻¹)
Ar	2.0	0.42	0.6	0.15	5.55
Mistura	2.0	0.42	80.0	0.12	6.29
Ar	6.0	1.26	1.8	0.11	5.80
Mistura	6.0	1.26	280.0	0.09	4.14

Mistura – Contém 4% (v/v) de CO₂, 21 % (v/v) de O₂ e 75% (v/v) de N₂

Jones e Greenfield (1982) apresentaram um trabalho de revisão sobre os efeitos de CO₂ no crescimento e na fermentação de leveduras, no qual é possível constatar a complexidade da acção de pressões acrescidas de CO₂ na actividade celular. Estes autores concluem que valores de pressão parcial de CO₂ entre 0.15 bar e 0.2 bar não afectam o crescimento da maior parte dos microrganismos com aplicação industrial. Mas, acima destas pressões tanto a actividade metabólica, assim como o crescimento dos mesmos microrganismos são afectados, sem no entanto, influenciar a viabilidade celular. De facto, no presente trabalho o aumento da pressão parcial de CO₂ diminui ligeiramente a taxa específica de crescimento (Tabela 4.6), o mesmo acontece com a concentração celular máxima obtida, que é cerca de 1.6 vezes menor com 280 mbar do que com 80 mbar de CO₂. Para este último ensaio realizado, embora não haja inibição do crescimento até ao total consumo do substrato (24 h), a concentração final sofre uma ligeira diminuição. Resultados semelhantes foram obtidos por Belo (1999) para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, no qual não foram observados

efeitos inibidores do crescimento perante o aumento da p_{CO_2} até 480 mbar. Embora para esta última pressão parcial de CO_2 tenha sido igualmente observada uma diminuição da concentração máxima de células, em relação aos restantes ensaios.

Em equilíbrio com o ar contendo 0.03 % (v/v) de CO_2 , a concentração de CO_2 em água é cerca de $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 1 bar e 25°C . Em meios de cultura a solubilidade do CO_2 é menor devido à presença de substratos orgânicos (Onken e Liefke, 1989). Em meios aquosos fracamente tamponados, os efeitos do CO_2 no metabolismo podem ser ainda uma consequência indirecta da alteração de pH, devido à formação de carbonato de hidrogénio a partir do CO_2 aquoso, com a consequente libertação de iões H^+ .

Desta forma pode colocar-se a hipótese de o aumento do CO_2 formado influenciar o pH da cultura. Através da Figura 4.14 é possível verificar que o comportamento do pH é bastante semelhante para todos os ensaios realizados com concentração crescente de dióxido de carbono.

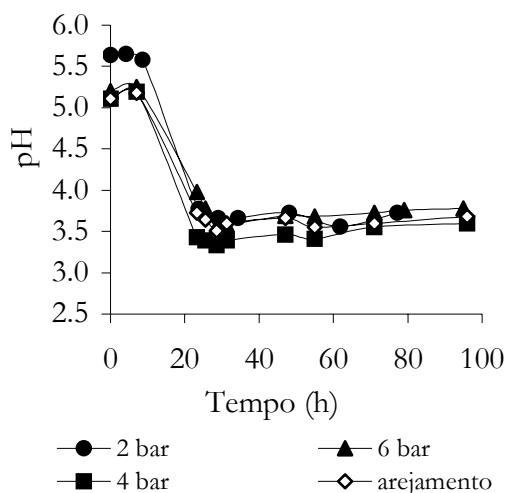


Figura 4.14 Variação do pH ao longo do tempo dos ensaios realizados com diferentes valores de pressão de ar, 2 bar e 6 bar e com a mistura de dióxido de carbono. Todos os ensaios foram realizados com uma concentração inicial de lactose de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

De ressaltar, no entanto, que os valores de pH foram obtidos medindo-se esta variável nas amostras à pressão atmosférica, o que não traduz correctamente a situação dentro do reactor.

É de esperar que dentro do reactor os valores de pH sejam inferiores aos da Figura 4.14, principalmente para os valores maiores de pressão estudados. No entanto, como os valores de pH decrescem rapidamente para valores inferiores a 5.0 para o ensaio à menor pressão, isto devido à actividade metabólica das células, significa que a espécie predominante no meio de cultura é o CO₂ (aq.)

Assim a fraca dissociação do CO₂ aos valores de pH observados permite inferir que é a molécula destes gás a principal causa dos efeitos inibidores observados.

4.3.2.3 O efeito da pressão de ar na síntese de β -galactosidase

Devido à importância que o arejamento tem na produção industrial da enzima β -galactosidase, estudou-se também a influência do aumento da pressão de ar na sua actividade. Esta enzima é utilizada na indústria alimentar, para a preparação e modificação de produtos que contêm lactose (Ranzi *et al.*, 1987; Cavaille e Combes, 1995; Athès *et al.*, 1998). Embora o processo produtivo seja conhecido ainda existem questões por resolver que poderão afectar a eficiência do processo, nomeadamente a influência da taxa de transferência de oxigénio (García-Garibay *et al.*, 1987; Barberis e Gentina, 1998). Lembre-se que os biorreactores industriais atingem alturas elevadas, que conduzem a quedas de pressão significativas, que por sua vez afectam este parâmetro.

De acordo com a Figura 4.15 verifica-se que durante a fase de arranque dos ensaios a actividade da enzima permanece baixa (entre 130-167 U·g⁻¹). Após esta fase a actividade da enzima aumenta atingindo o seu valor máximo na fase exponencial, 265-381 U·g⁻¹. A actividade específica máxima (381 U·g⁻¹) foi obtida para o valor de pressão mais elevado, *i.e.*, 6 bar.

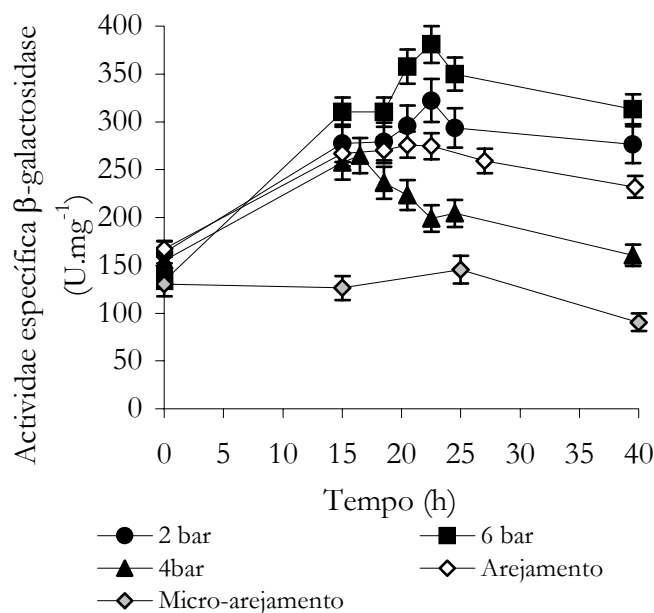


Figura 4.15 Actividade específica da enzima β -galactosidase de culturas de *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 ao longo do tempo dos ensaios em descontínuo com pressão crescente de ar: 2 bar, 4 bar, e 6 bar, arejamento e micro-arejamento, com $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de lactose inicial.

Inchaurreondo *et al.* (1994) observaram o mesmo comportamento para a enzima β -galactosidase durante a fase exponencial, e após atingida a actividade enzimática máxima, esta permaneceu estável mesmo após 1 h a 2 h do início da fase estacionária.

De modo contrário, é possível observar na Figura 4.15, que a actividade da enzima, logo após atingir o seu valor máximo, diminui, embora ligeiramente, ao longo da fase estacionária de crescimento, até ao final dos ensaios. O facto da actividade enzimática da β -galactosidase diminuir a partir do início da fase estacionária é explicada pelo total consumo do seu indutor, que é a lactose. De facto, se se observar novamente a Figura 4.9, verifica-se que entre as 20 h e as 40 h do decorrer dos ensaios, a lactose é totalmente consumida, iniciando-se de seguida a fase estacionária do crescimento celular.

Estes resultados sugerem que após atingida a actividade enzimática máxima, deve-se parar imediatamente a operação para garantir o máximo da actividade no

final. Segundo Inchaurredo *et al.* (1994) a síntese desta enzima poderá estar directamente relacionada com as condições da cultura, nomeadamente com a concentração de oxigénio dissolvido e com a taxa específica de crescimento. García-Garibay *et al.* (1987) verificaram que a produção desta enzima, a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus*, estava relacionada com o k_{La} e consequentemente, OTR da cultura.

Ao observar a Figura 4.16 verifica-se que, o aumento da taxa de transferência de oxigénio tem um efeito positivo na produtividade específica desta enzima. Inclusivamente, a produtividade específica da β -galactosidase, aumenta de $5.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para $16.9 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, quando se passa de uma condição de micro-arejamento, correspondendo a um valor de OTR de $96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, para uma situação de pressurização a 6 bar de ar, com $1099 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de OTR .

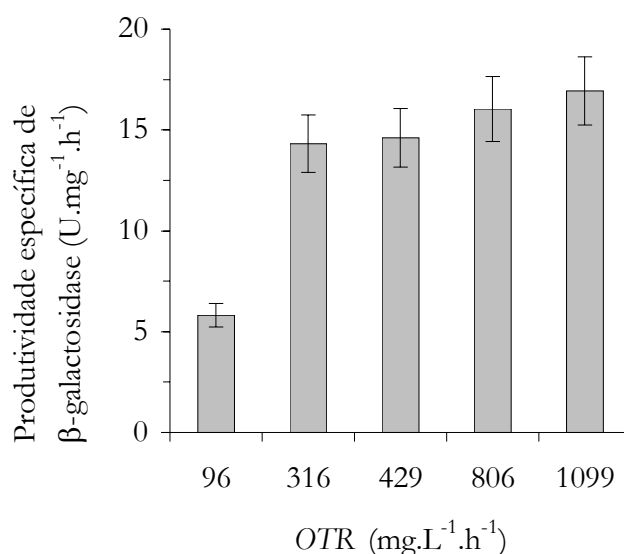


Figura 4.16 Produtividade específica da enzima β -galactosidase de culturas de *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 em função de OTR . São apresentados os valores médios \pm erro padrão.

Estes resultados vão de encontro aos obtidos por García-Garibay *et al.* (1987), nos quais, quando se operava com valores de OTR elevados, a concentração

celular aumentava significativamente, aumentando desta forma a produção de β -galactosidase.

No que respeita à produtividade específica da β -galactosidase, quando se compararam os dois sistemas de arejamento, com valores de *OTR* próximos $365 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $429 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, para 2 bar de pressão de ar e arejamento à pressão atmosférica em matraz, respectivamente, verifica-se que os resultados são muito semelhantes (Figura 4.16).

A baixa produtividade específica em β -galactosidase obtida no ensaio com micro-arejamento pode ser devido à existência de limitação da concentração de oxigénio no meio de cultura.

Com os resultados obtidos, conclui-se que o arejamento de culturas de *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 com ar hiperbárico até 6 bar de ar não inibe a produção de β -galactosidase. Assim, é possível a utilização de uma pressão de ar até 6 bar para a optimização dos processos de produção da enzima β -galactosidase, especialmente em culturas de elevada densidade celular, nas quais o oxigénio é um factor limitante do crescimento.

4.4 Conclusões

Foi demonstrado neste capítulo que as duas estirpes de levedura estudadas, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022 e *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, não são inibidas para pressões totais de ar até 6 bar de ar, e consequentemente, até pressões parciais de oxigénio de 1.26 bar. No entanto, a concentração de substrato inicial utilizado, revelou-se de extrema importância no efeito da pressão sobre o metabolismo de ambas as leveduras. De facto, para concentrações de lactose superiores a $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nenhuma das estirpes foi capaz de metabolizar o açúcar na sua totalidade.

A diferença encontrada no metabolismo oxidativo do etanol, permitiu concluir que o aumento da pressão favorece a assimilação do etanol produzido pelas células da levedura *Kluyver* negativa (*Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022). Por outro lado, também se conclui que o aumento da pressão até 6 bar de ar aumenta a inibição celular pelo substrato e inibe a actividade fermentativa.

Relativamente à estirpe *Kluyver* positiva para a lactose (*Kluyveromyces marxianus* CBS 7894), verificou-se que o aumento da pressão total de ar até 6 bar, aumentou consideravelmente a produtividade em biomassa, assim como a taxa específica de crescimento, indicando que esta estirpe tolera pressões de ar superiores à atmosférica.

Utilizando de futuro culturas de elevada densidade celular, que justifiquem estes valores de pressão, poderá ser possível conseguirem-se elevadas produtividades em biomassa, evitando a necessidade de aumentar a velocidade de agitação e o caudal de arejamento, ou ainda a adição de oxigénio puro.

Com os valores de pressão parcial de dióxido de carbono testados, no valor máximo de 280 mbar, foi possível constatar a existência de uma ligeira inibição

do crescimento pelo dióxido de carbono, traduzindo-se por uma redução da taxa específica de crescimento.

Em relação aos dois sistemas de arejamento utilizados para aumentar a taxa de transferência de oxigênio no meio de cultura: aumento da velocidade de agitação e arejamento à pressão atmosférica e pressurização com 2 bar de ar, constatou-se que o comportamento fisiológico da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 foi bastante semelhante em ambas as situações. No entanto, em termos de economia de processo, seria mais proveitoso o recurso ao aumento da pressão de apenas 1 bar de ar, do que incrementar a potência de agitação, pois poderia importar custos energéticos acrescidos.

Com os resultados obtidos conclui-se que é possível otimizar os processos de produção da enzima β -galactosidase, através do aumento da taxa de transferência de oxigênio, utilizando o aumento da pressão total de ar, especialmente em culturas de elevada densidade celular, onde a oxigenação do meio é muitas vezes insuficiente. O estudo da aplicação da pressão a uma estirpe super-produtora de β -galactosidase, terá certamente muito interesse pois permitirá otimizar a produtividade do processo industrial desta enzima.

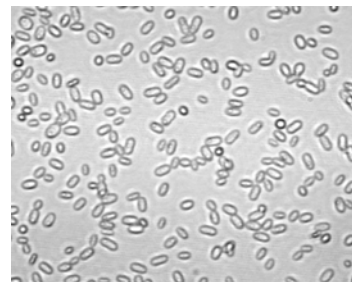
Capítulo 5

Efeito da pressão no metabolismo da levedura

Candida utilis

“Mankind has two fundamental factors, T and P, which offer many chances in the field of bioscience and biotechnology for new challenges because they can act on the face which is made by T and P axes not simple changing of only T.”

Hayashi, 1996



Capítulo 5

Efeito da pressão no metabolismo da levedura

Candida utilis

Sumário

A levedura *Candida utilis* é utilizada na produção de proteína microbiana devido à sua elevada actividade respiratória, conteúdo em proteína, perfil de aminoácidos e também devido à sua capacidade em metabolizar uma vasta e variada gama de substratos.

Neste capítulo, propõe-se a utilização do ar hiperbárico como forma de aumentar a taxa de transferência de oxigénio em culturas de *Candida utilis* CBS 621, principalmente em culturas de elevada densidade celular. Com base neste facto, averiguou-se qual o efeito do aumento da pressão total de ar e, consequentemente, da pressão parcial de oxigénio no metabolismo desta levedura, em cultura descontínua, utilizando duas densidades celulares na fase de arranque dos ensaios, 0,5 g · L⁻¹ e 10 g · L⁻¹. Demonstrou-se que para uma baixa densidade celular, 0,5 g · L⁻¹, o aumento da pressão inibe o crescimento celular, sendo este efeito inexistente quando se utilizou uma densidade celular superior, 10 g · L⁻¹.

Concluiu-se que o aumento da pressão total de ar até 6 bar não inibiu o crescimento celular da levedura *Candida utilis* CBS 621. Foi ainda possível constatar o efeito positivo da pressão de ar em cultura semi-contínua. De facto, o efeito do aumento da pressão revelou-se bastante vantajoso quando se operou em cultura semi-contínua de elevada densidade celular. Com 6 bar de pressão de ar, houve limitação de oxigénio no meio de cultura, devido à elevada densidade celular atingida, 40 g · L⁻¹. No entanto, esta limitação foi ultrapassada com 12 bar de ar, não se verificando decréscimo da concentração celular ao longo do tempo.

A análise de imagem realizada durante a cultura semi-contínua veio confirmar que, para os valores de pressão estudados, não foram encontradas diferenças nos parâmetros de morfologia que indiquem toxicidade do oxigénio.

5.1 Introdução	150
5.2 Material e Métodos	154
5.3 Resultados e Discussão	159
5.4 Conclusões	182

5.1 Introdução

A levedura *Candida utilis* é utilizada na produção de proteína microbiana devido à sua elevada actividade respiratória, conteúdo em proteína, perfil de aminoácidos e também devido à sua capacidade em metabolizar uma vasta e variada gama de substratos (Ghoul *et al.*, 1991).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é incapaz de utilizar pentoses como substrato para o seu crescimento ou para a produção de etanol, com a excepção da xilose. Como resultado, os biotecnólogos procuraram outras leveduras com a capacidade de assimilar este tipo de açúcares. Uma vez que a levedura *Candida utilis* tem a capacidade de metabolizar pentoses, hexoses e ácidos orgânicos, é bastante aplicada na produção de proteína microbiana para as rações de animais e também na alimentação do Homem (Prior e Kötter, 1997).

Esta levedura tem sido alvo de vários trabalhos de investigação, não só pela capacidade em assimilar diversos tipos de compostos de carbono, mas também pela sua popularidade nos estudos fisiológicos acerca do tipo de metabolismo em diversos tipos de açúcares, sendo considerada um modelo de levedura *Crabtree*-negativa que exhibe transporte activo para a glucose (van Urk *et al.*, 1989; van Dijken *et al.*, 1993; Weusthuis, 1994; van den Broek *et al.*, 1997). Devido ao carácter de utilização industrial que esta levedura tem, a optimização das condições operacionais para a produção de proteína microbiana tem sido também alvo de vários estudos de investigação (Ghoul *et al.*, 1991; Correia e Sezedello, 1995).

5.1.1 A taxonomia da levedura *Candida utilis*

Em 1926, Hennerberg descobriu que esta levedura estava presente em praticamente todas as indústrias alemãs como um contaminante. Na produção industrial de fermento de padeiro, 10 % da composição final da levedura

compactada era a levedura *Candida utilis*, a qual, na fase de arranque, constituía apenas uma pequena contaminação. Após uma breve descrição desta levedura, Hennerberg designou-a de *Torula utilis*. Posteriormente, e devido à atribuição deste mesmo nome a um fungo, os investigadores optaram por designá-la de *Torulopsis utilis*. Mais tarde, esta levedura volta a ter outra designação, pois é transferida para o género *Candida*, devido à sua capacidade de formar um pseudo-micélio relativamente bem desenvolvido, especialmente em condições de anaerobiose (Phaff, 1985).

5.1.2 Propriedades morfológicas e fisiológicas

As células novas de *Candida utilis*, quando crescem em meio com glucose, extracto de levedura e peptona, apresentam forma ovóide-cilíndrica, com aproximadamente 3.5 µm a 4.5 µm por 7 µm a 13 µm (Phaff, 1985).

Esta levedura fermenta a glucose, a sacarose e a rafinose. Pelo contrário, outros açúcares como a galactose, a maltose, a celobiose e a lactose, entre outros, não são fermentados pela levedura *Candida utilis*. Tem também a capacidade de metabolizar hidrolisados celulósicos, como a xilose, sem precisar de aminoácidos ou vitamina B para o seu crescimento, e tem uma elevada taxa específica de crescimento na presença de sais amoniacaais como principal fonte de azoto (Phaff, 1985).

A levedura *Candida utilis* é um microrganismo fermentativo facultativo. Nesta levedura, a formação de etanol a partir da glucose não ocorre em condições de aerobiose estrita. No entanto, em condições de limitação de oxigénio, a glucose é rapidamente fermentada em etanol (Weusthuis, 1994). Relativamente à maltose, esta levedura exhibe o efeito de *Kluyver*; isto é, em condições aeróbias não se observa formação de etanol (Kaliterna *et al.*, 1995). Em condições de limitação de oxigénio e operação contínua, a quantidade de maltose que é metabolizada está limitada pela quantidade de oxigénio disponível no meio de cultura. Quando se diminui a concentração de oxigénio alimentado a esta cultura, não se observa

formação de etanol e a maltose é apenas parcialmente consumida. Pelo contrário, quando se utiliza outro substrato, como por exemplo a glucose, esta levedura fermenta e respira simultaneamente este substrato. O que indica que, para a levedura *Candida utilis*, a disponibilidade de oxigénio não é um factor importante no efeito de *Kluyver* para a maltose. No entanto, este efeito parece reflectir uma incapacidade intrínseca para fermentar alguns dissacarídeos, como é o caso da sacarose (Weusthuis, 1994).

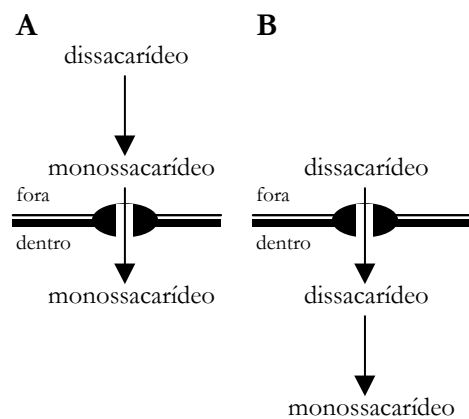


Figura 5.1 Diferentes formas do metabolismo de um dissacarídeo nas leveduras. A) Hidrólise extracelular do dissacarídeo seguido do transporte dos monossacarídeos, que é o caso da sacarose. B) Transporte do dissacarídeo seguido da hidrólise intracelular, que é o caso da lactose e da maltose (Weusthuis, 1994).

5.1.3 O metabolismo da sacarose

A sacarose é a principal fonte de carbono nos processos industriais para a produção de proteína microbiana a partir de melaços. A maior parte dos melaços é obtida como um sub-produto da refinação da cana do açúcar e da beterraba. É o principal substrato para a produção de fermento de padeiro, *Saccharomyces cerevisiae*. Este dissacarídeo é hidrolisado por uma enzima extracelular (invertase) em glucose e frutose que, por sua vez, penetram nas células (Figura 5.1). A estirpe mais utilizada na produção de rações alimentares é uma estirpe da espécie *Candida utilis*. A rápida multiplicação das células desta levedura na sacarose

também depende da concentração residual de glucose, que poderá reprimir a síntese da invertase (Boze *et al.*, 1992).

5.1.4 Aplicações industriais

Têm sido utilizadas, há mais de seis décadas, estirpes de *Candida utilis* na produção industrial da “levedura Torula”, a qual é, por sua vez, incorporada em rações para animais e em alimentos para o Homem. Durante a 2ª Guerra Mundial, esta levedura foi bastante utilizada na produção de rações alimentares, utilizando como fonte de carbono, efluente de licor de sulfito e de açúcares da celulose, obtidos a partir da hidrólise dos componentes da madeira. Subsequentemente, muitos processos industriais utilizam o licor de sulfito (um sub-produto da indústria do papel com 15 % a 22 % (p/p) de hexoses ou pentoses) como matéria-prima, para a produção de levedura *Candida utilis*. O etanol é outro substrato que é utilizado na produção contínua de levedura *Candida utilis* (Phaff, 1985; Prior e Kötter, 1997).

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Microrganismo e manutenção

Nestes ensaios utilizou-se uma estirpe de levedura *Candida utilis* CBS 621 a qual foi adquirida na colecção *Centraal Bureau voor Schimmelcultures* (CBS, Delft, The Netherlands).

A estirpe foi mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, em tubos criogénicos específicos (Microbank, Pro-Lab Diagnostics). A reactivação das células foi feita em meio sólido com composição semelhante à do meio líquido, com adição de $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, em caixa de Petri. As colónias obtidas após incubação a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas foram utilizadas para repicar tubos de agar inclinado. Estes foram mantidos no frigorífico a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.2 Meios e condições de cultura

Para obter o inóculo de cada ensaio utilizaram-se tubos inclinados para inocular meio de cultura em matraz. A cultura obtida foi incubada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a 150 rpm durante cerca de 12 h, em meio de cultura com $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose. O meio de cultura semi-sintético utilizado tinha a composição apresentada na Tabela 5.1.

Todos os constituintes do meio de cultura foram dissolvidos em tampão citrato 0.1 M pH 5.0. O pH foi ajustado a 5.0 antes da esterilização em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao meio utilizado na cultura em biorreactor foram adicionadas 3 gotas de agente anti-espuma de silicone (Merk 7743).

Tabela 5.1 Composição do meio de cultura de levedura *Candida utilis* CBS 621 para os ensaios realizados em descontínuo

Composto	Marca	(g · L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	BDH	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck	1.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Merck	0.4
Extracto de levedura	Merck	1.0
Sacarose	Merck	Variável*

* De 5 g · L⁻¹ a 50 g · L⁻¹ conforme o ensaio

Preparação do tampão citrato, 0.1 M, pH 5.0

Dissolver 20.5 g de ácido cítrico monohidratado e 15.7 g de hidróxido de sódio 50 % (p/v) em água destilada
Perfazer a 1 L com água destilada

5.2.3 Condições de operação

Neste capítulo recorreu-se a dois biorreactores de pressão. Numa primeira etapa realizaram-se ensaios descontínuos no biorreactor Parr. O segundo conjunto de ensaios, também em operação descontínua, foi realizado no biorreactor Whitey de 1 L variando a concentração inicial de células. Finalmente, e numa terceira e última etapa, depois de seleccionadas as condições de operação, realizaram-se ensaios em cultura semi-contínua, no biorreactor Parr. Em simultâneo com os ensaios nos biorreactores hiperbáricos, também foram realizados ensaios de controlo em matraz.

As condições de operação relativas aos três conjuntos de ensaios são descritas nos sub-capítulos seguintes.

5.2.3.1 Ensaios em descontínuo

Numa primeira parte do trabalho foi utilizado o biorreactor Parr. Operou-se em descontínuo utilizando um volume de meio de cultura de 0.3 L, e uma

concentração celular inicial de $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Após carregar o biorreactor com meio inoculado, ajustaram-se as condições de operação de caudal de arejamento e de pressão, a temperatura foi de 30°C e a agitação de 400 rpm, os ensaios decorreram durante cerca de 58 h. Os ensaios foram realizados com caudal de ar constante, $0.3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (medido nas condições PTN), a que corresponde um caudal molar de oxigénio de $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Estudou-se o efeito do aumento da pressão de ar variável entre 1.2 bar e 6 bar. Em todos estes ensaios utilizou-se uma concentração de sacarose inicial de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Numa segunda parte, foram realizados ensaios em descontínuo no biorreactor Whitey de 1 L, com diferentes densidades celulares na fase de arranque. Com estes ensaios pretende-se averiguar qual o efeito da pressão em culturas com densidade celular de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, comparativamente a culturas com menor densidade celular de $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Em todos estes ensaios utilizou-se uma concentração de sacarose inicial de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Após carregar o reactor com meio previamente inoculado (o inóculo representa 10 % do volume final), ajustaram-se as condições de operação de pressão, bem como as restantes condições fixadas nos valores seguintes: caudal de arejamento, 1 vvm, temperatura, 30°C e agitação, 160 rpm, cada ensaio teve a duração de cerca de 58 h. Os ensaios foram realizados com caudal de ar constante, $0.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (medido nas condições PTN), variando-se a pressão total de ar entre 1.2 bar e 6 bar. Simultaneamente, foi realizado um ensaio controlo com micro-arejamento (matraz).

O biorreactor Parr apresenta uma configuração diferente do biorreactor Whitey. Ambos os reactores são vasos cilíndricos de aço inoxidável, no entanto, o reactor Whitey encontra-se posicionado horizontalmente, enquanto que, o reactor Parr, encontra-se posicionado na vertical. Assim, a altura de líquido dentro do reactor Whitey é bastante menor do que a altura de líquido no reactor Parr, bem como a superfície livre de líquido em contacto com o ar é maior no caso do reactor Whitey. Além disto, os sistemas de agitação dos reactores são também diferentes, o sistema de agitação do biorreactor Parr, faz-se através da

rotação de dois impulsores de turbina com lâminas inclinadas, enquanto que o biorreactor Whitey é agitado axialmente, sem qualquer tipo de agitador interno.

5.2.3.2 Ensaios em semi-contínuo

Os ensaios em modo semi-contínuo foram realizados no biorreactor Parr, com uma agitação de 400 rpm, uma temperatura de 30 °C e caudal de arejamento de 0.15 L min⁻¹ a 0.49 L min⁻¹ (PTN), ajustado manualmente de modo a acompanhar o aumento do volume de meio dentro do reactor (de 0.15 L a 0.49 L). As condições de operação mantiveram-se constantes em todos os ensaios, apenas se variou a pressão de ar entre 1 bar, 6.0 bar e 12 bar.

O inóculo foi preparado da mesma forma dos ensaios descritos no sub-capítulo 5.2.2. Os ensaios arrancaram de um modo descontínuo num meio de cultura contendo 1 g L⁻¹ de sacarose inicial num volume de 175 mL. Ao fim de 1 h foi iniciada a operação semi-contínua pela adição de meio contendo 100 g L⁻¹ de sacarose, a caudal crescente (taxa de diluição constante igual a 0.025 h⁻¹). A operação decorreu durante 40 h. Na operação em semi-contínuo foi utilizado meio de cultura mais concentrado (Tabela 5.2) preparado com tampão citrato 0.1 M pH 5.5. Foram utilizadas duas concentrações de células diferentes na fase de arranque dos ensaios, 5 g L⁻¹ e 15 g L⁻¹.

Tabela 5.2 Composição do meio de cultura de *Candida utilis* CBS 621 para os ensaios realizados em semi-contínuo

Composto	Marca	(g L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	BDH	7.5
(NH ₄)SO ₄	Merck	5.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck	1.0
Extracto de levedura	Merck	5.0
Sacarose	Merck	100.0

5.2.4 Monitorização

O efeito da concentração celular inicial, do caudal de arejamento, da pressão e do modo de operação, no comportamento celular foi estudado em cada ensaio através da monitorização da variação ao longo do tempo de vários parâmetros, tais como: crescimento celular, consumo de sacarose e produção de etanol. Com estes dados foram determinados rendimentos, produtividades e taxas específicas de crescimento.

De forma a averiguar se o aumento da pressão levaria a alterações morfológicas das células de levedura, recorreu-se à técnica de análise de imagem para analisar e processar as amostras recolhidas ao longo do tempo nos ensaios realizados em semi-contínuo.

5.3 Resultados e Discussão

Os resultados seguidamente apresentados foram realizados em dois biorreactores de pressão diferentes: biorreactor Parr e biorreactor Whitey de 1 L. No primeiro, estudou-se o efeito da pressão, no metabolismo da levedura, em ensaios a operar em descontínuo (sub-capítulo 5.3.1.1), e em semi-contínuo (sub-capítulo 5.3.2). No biorreactor Whitey de 1 L estudou-se a influência da pressão de ar e da densidade celular no comportamento metabólico da levedura (sub-capítulo 5.3.1.2). Finalmente, no sub-capítulo 5.3.3 encontra-se a discussão dos resultados obtidos a partir da análise à morfologia celular obtida por técnicas de análise de imagem realizadas às células colhidas nos ensaios em semi-contínuo.

5.3.1 Ensaios em descontínuo

5.3.1.1 Efeito da pressão no metabolismo - biorreactor Parr

Com esta série de ensaios pretendeu-se averiguar qual a influência da taxa de transferência de oxigénio no metabolismo da levedura *Candida utilis* CBS 621. Foram determinadas as respectivas taxas de transferência de oxigénio (*OTR*) correspondentes a cada valor de pressão ensaiado (Figura 5.2). Com base nos valores de *OTR*, determinaram-se os valores de coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio (k_{La}). Na Figura 5.2 é visível que o parâmetro *OTR* aumenta com a pressão total de ar, e consequentemente com a pressão parcial de oxigénio. No entanto, o k_{La} diminui com o aumento da pressão total de ar, sendo este decréscimo menos acentuado de 3 bar para 6 bar, isto é, a diminuição não é linear com a pressão.

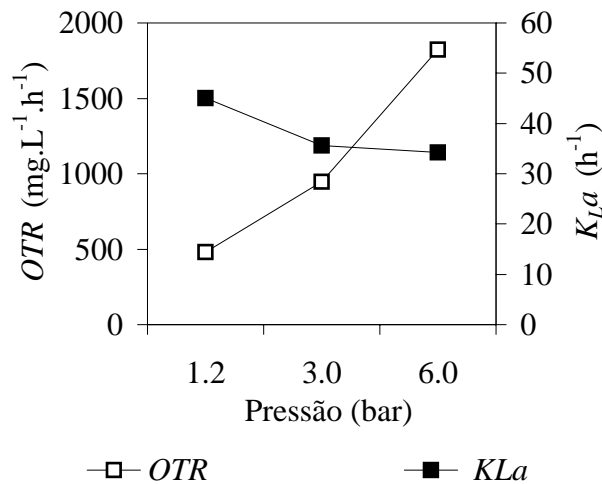


Figura 5.2 O efeito da pressão na taxa de transferência de oxigénio (OTR) e no coeficiente global volumétrico de transferência de oxigénio (k_{La}) no biorreactor Parr.

Segundo Oyevaar *et al.* (1988) o coeficiente de transferência de massa na fase líquida, k_L , é independente da pressão total de ar do biorreactor, desta forma, os efeitos observados têm que ser atribuídos a alterações da área interfacial líquido-gás (a). Segundo Sato *et al.* (1981) o aumento de OTR com a pressão total de ar deve-se ao decréscimo do diâmetro das bolhas de gás (ar) o que leva ao aumento da área interfacial, a . Mais recentemente, Maier *et al.* (2001) provou que o k_{La} , num reactor agitado e com caudal volúmico constante, não era afectado pela pressão total de ar numa gama de valores que variavam entre 1 bar e 10 bar. No entanto, não foram estas as condições utilizadas nos ensaios da presente dissertação. Relembre-se que, foi utilizado sempre o mesmo caudal molar de ar em todos os ensaios realizados a diferentes pressões, pelo que, o caudal volúmico de ar e consequentemente a velocidade superficial de gás dentro do reactor diminui com o aumento da pressão. Este facto explica o decréscimo de k_{La} observado na Figura 5.2, pois de acordo com a equação 2.16 (sub-capítulo 2.3.4.1.2) o k_{La} é mais sensível à variação da velocidade do gás do que à variação da pressão, dada a diferença dos respectivos valores de expoentes da referida equação.

Na Figura 5.3 são apresentadas as curvas de crescimento, consumo e produção de etanol, relativas aos ensaios realizados no biorreactor Parr.

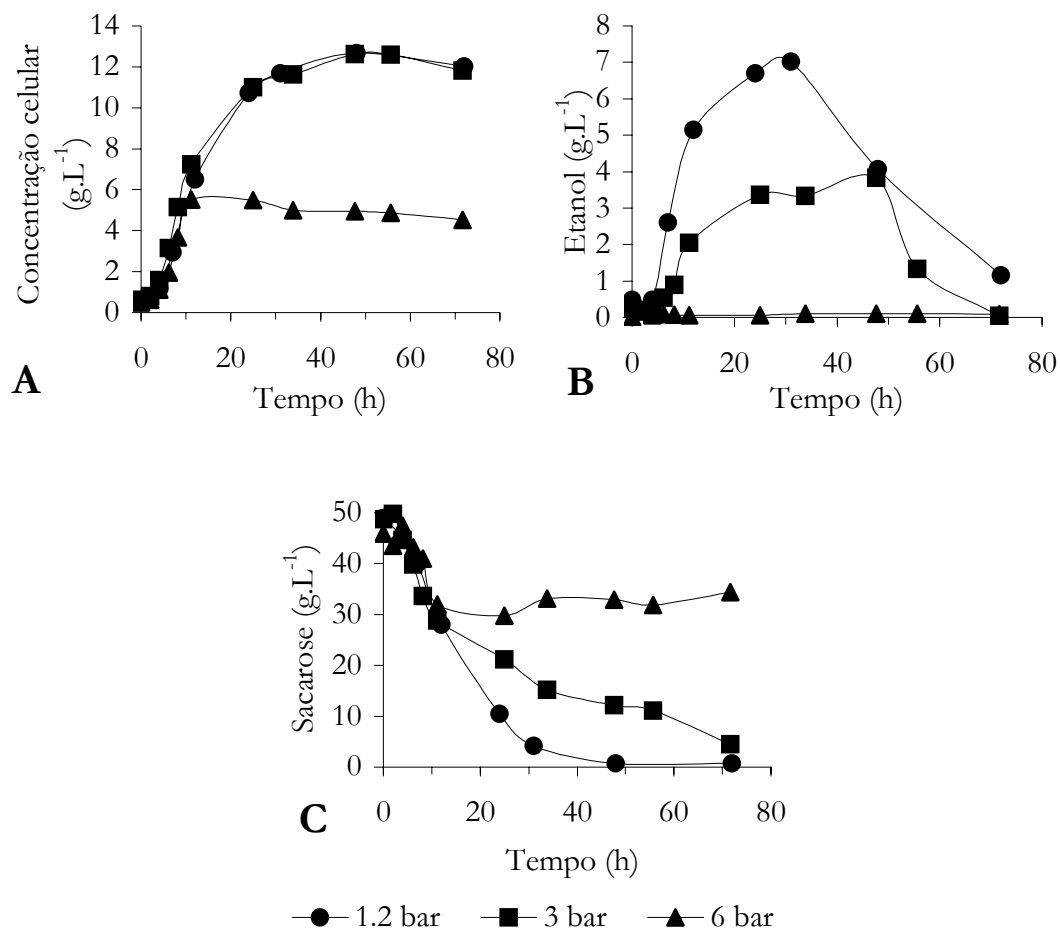


Figura 5.3 Variação da biomassa (A), etanol (B) e sacarose (C) ao longo do tempo de fermentação, com 1.2 bar, 3 bar e 6 bar de pressão de ar e no biorreactor Parr, com uma concentração inicial de sacarose de 50 g.L⁻¹, com uma concentração inicial de biomassa de 0.5 g.L⁻¹ com o caudal de ar constante, 0.3 L.min⁻¹ (PTN).

Os resultados observados para a variação da concentração celular ao longo do tempo dos ensaios com valores de pressão de 1.2 bar e 3 bar de ar são praticamente coincidentes. Ao contrário, a concentração máxima de etanol produzida diminui com o aumento da pressão. Esta diferença encontrada reflecte-se no consumo de sacarose, que até ao final do ensaio ainda não tinha sido completamente metabolizada pelas células de levedura. No entanto, no caso

dos ensaios com 1.2 bar e com 3 bar, após praticamente 50 h decorridas do arranque do ensaio, o etanol começa a ser oxidado, em detrimento da sacarose que ainda está presente. Igualmente, Weusthuis (1994) verificou que a levedura *Candida utilis* CBS 621, assimilava preferencialmente o etanol em vez da maltose, em condições de arejamento.

Quando se aumenta a pressão para 6 bar e após 10 h do arranque do ensaio, verifica-se inibição do crescimento celular. É interessante verificar que para este valor de pressão não houve produção de etanol durante as primeiras 10 h de crescimento. Resultados em concordância com os obtidos para a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022 (Figura 4.3).

Na Tabela 5.3 encontram-se resumidos os parâmetros de crescimento obtidos a partir da realização deste conjunto de ensaios.

Tabela 5.3 Parâmetros de crescimento máximos obtidos nos ensaios com caudal de ar constante ($0.3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, PTN) para 1.2 bar, 3 bar e 6 bar de pressão de ar, rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$), rendimento em etanol ($Y_{E/S}$), taxa específica de crescimento (μ), taxa de consumo de substrato (qs) e produtividade máxima, após 48 h (P_X)

	Pressão de ar		
	1.2 bar	3.0 bar	6.0 bar
$Y_{X/S}$ (%)	25.5	32.8	34.1
$Y_{E/S}$ (%)	13.0	9.2	0.6
μ (h^{-1})	0.21	0.31	0.28
qs ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	8.2	9.5	8.2
P_X ($\text{mg} \cdot \text{h}^{-1}$)	251.4	251.8	93.1

O aumento da pressão de 1.2 bar para 3.0 bar aumenta o rendimento em biomassa cerca de 1.3 vezes. Este aumento reflecte-se ainda na taxa específica de crescimento, assim como no consumo da sacarose. Embora as diferenças encontradas no rendimento em biomassa não sejam significativas, o valor da

produtividade traduz mais claramente a baixa produção de biomassa que se obteve para 6 bar de pressão de ar.

5.3.1.2 Efeito da pressão no metabolismo da levedura para diferentes densidades celulares

Em processos industriais de produção de proteína microbiana atingem-se elevados valores de densidade celular, como é o caso da produção de levedura *Candida utilis*. Com base neste facto averiguou-se qual seria o efeito do aumento da pressão total de ar e consequentemente, da pressão parcial de oxigénio, no metabolismo desta levedura a crescer em cultura com elevada densidade celular. Para tal, utilizaram-se dois valores distintos de densidade celular na fase de arranque dos ensaios, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. O objectivo desta parte do trabalho, não foi apenas estudar a toxicidade do oxigénio pelo aumento da pressão de ar, em culturas desta levedura, mas também, averiguar se a aplicabilidade do ar hiperbárico depende da densidade celular da cultura inicial.

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com ar hiperbárico, no biorreactor Whitey de 1 L, com micro-arejamento e com $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, apresentam-se na Figura 5.4.

Apenas no ensaio com micro-arejamento a sacarose é totalmente consumida após 24 horas do arranque do ensaio. Nestas condições de operação o metabolismo é predominantemente fermentativo, atingindo-se uma concentração máxima de etanol de $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, muito superior à concentração celular, que foi apenas $6.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Nos ensaios realizados com pressão de ar superior à atmosférica, o consumo de substrato é muito lento e para valores de pressão de ar superiores ou iguais a 3 bar, após 10 h do início dos ensaios, verifica-se inibição do crescimento, não havendo consumo de substrato, nem produção de etanol. No entanto, com 1.2 bar de pressão de ar, embora o consumo de sacarose seja mais lento do que

na experiência realizada com micro-arejamento, a biomassa produzida é bastante superior, $9.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, assim como, o etanol produzido é inferior, $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Tal comportamento não ocorreu nos restantes ensaios com pressão.

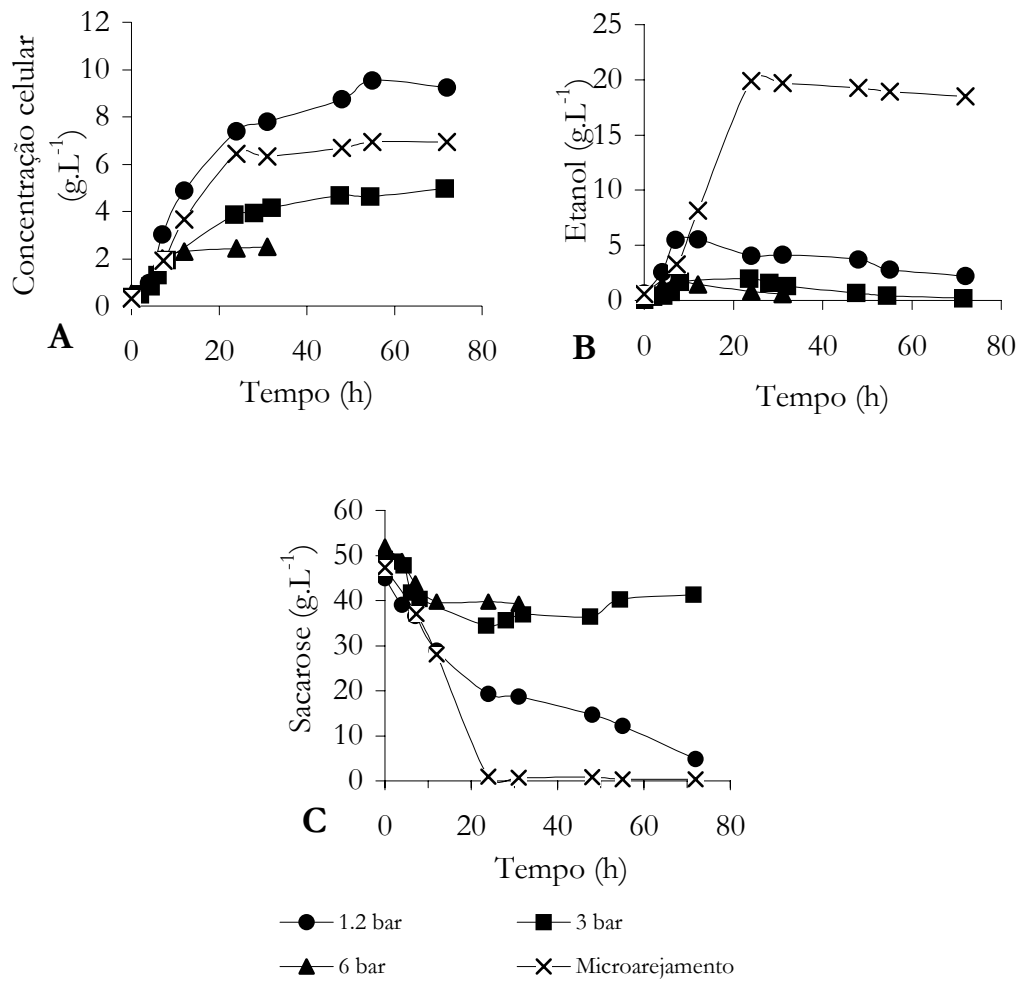


Figura 5.4 Variação da biomassa (A), etanol (B) e sacarose (C) ao longo do tempo de fermentação, com 1.2 bar, 3 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreactor Whitey de 1 L, com uma concentração inicial de sacarose de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e com uma concentração de biomassa inicial de $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Aparentemente estes resultados sugerem que existe algum tipo de inibição pelo oxigénio, uma vez que, se se tratasse de inibição pelo substrato, também não

haveria crescimento no ensaio com micro-arejamento. De facto, nem todas as espécies se comportam da mesma forma quando sujeitas a um aumento da pressão parcial de oxigénio. Segundo Onken e Liefke (1989), existem espécies que não crescem com pressões parciais de oxigénio iguais ou superiores a 1 bar (pressão total de ar igual 4.8 bar).

Uma forma indirecta de verificar se o oxigénio está em excesso será através da determinação da taxa específica de consumo de oxigénio (q_{O_2}) da levedura *Candida utilis* CBS 621. Para tal, recorreu-se a um biorreactor à pressão atmosférica (pressão total de ar igual a 1 bar – biorreactor Biolab) acoplado com uma sonda de oxigénio para a determinação deste parâmetro.

Para além da determinação do q_{O_2} , este ensaio foi extremamente importante para verificar a existência de limitação da concentração de oxigénio dissolvido no meio de cultura (Figura 5.5). Após 10 h do arranque da operação, a concentração de oxigénio dissolvido caiu a zero, apesar da velocidade de agitação de 400 rpm e do caudal de arejamento de $1.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. Note-se que estes valores referidos são bastante superiores aos do biorreactor Whitey de 1 L, no qual a velocidade de agitação é de 160 rpm e o caudal de arejamento é de $0.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (PTN).

Desta forma, foi possível confirmar que, à pressão atmosférica, as células de levedura não tinham oxigénio disponível suficiente para a sua actividade respiratória durante a fase exponencial de crescimento, apesar de se estar a operar com densidades celulares relativamente baixas.

Aplicando-se o método dinâmico no início da fase exponencial de crescimento (Figura 5.5) determinou-se a taxa específica de consumo de oxigénio, q_{O_2} , das células de levedura *Candida utilis* CBS 621. Quando se comparam os valores experimentais com os que estão disponíveis na literatura (Tabela 5.4) verifica-se que o valor de q_{O_2} experimental, $108 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, situa-se entre os valores propostos por Weusthuis *et al.* (1994) e por van Urk *et al.* (1989), $80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $211 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente.

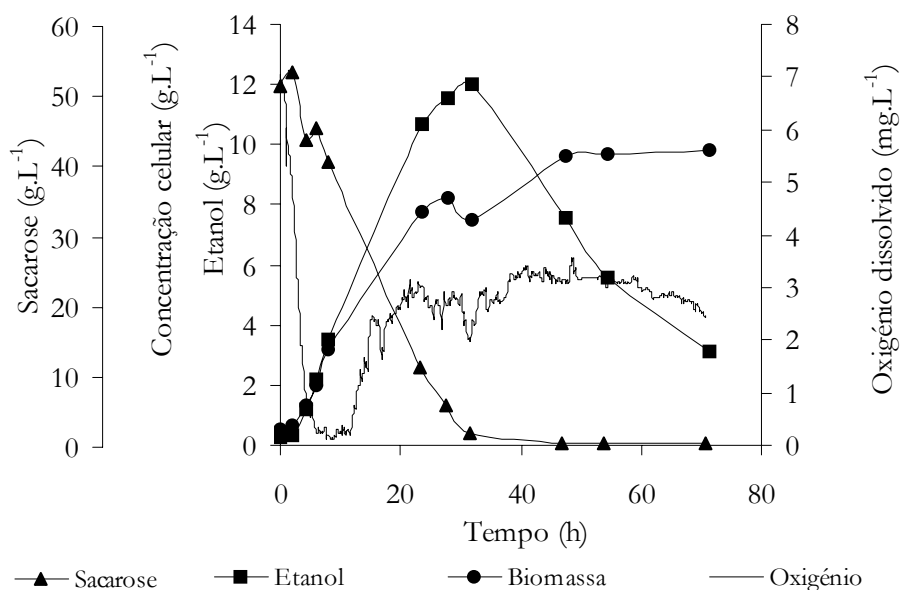


Figura 5.5 Variação da concentração celular, concentração de etanol, concentração de sacarose e concentração de oxigênio dissolvido, durante a cultura descontínua no biorreactor Biolab, à pressão atmosférica, a 30 °C, 400 rpm e 1.5 L min⁻¹ (1vvm) de caudal de arejamento.

Usando-se o valor de q_{O_2} experimental obtido para estimar a taxa de consumo de oxigênio, OUR , de culturas com densidades idênticas às utilizadas nas experiências (0.5 g L⁻¹ e 10 g L⁻¹), verifica-se que, os valores obtidos são sempre inferiores à taxa de transferência máxima prevista para as condições de pressão utilizadas (Tabela 5.4). Isto sugere que a concentração de oxigênio dissolvido é sempre superior às necessidades metabólicas da levedura, principalmente para os maiores valores de pressão. De facto, como a carência de oxigênio é inferior ao OTR , principalmente a 6 bar para a baixa gama de concentração celular estudada, este valor de pressão de ar resulta na inibição da actividade celular.

Relembre-se no entanto, que, os valores de OTR foram estimados em ensaios em branco, cujo meio tem características diferentes do meio de cultura, pelo que, os valores de OTR poderão estar sobrestimados.

Tabela 5.4 Valores da taxa de consumo de oxigénio máximo ($OUR = q_{O_2} \cdot X$) das células de levedura *Candida utilis* CBS 621, para $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e para $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, baseada na taxa específica de consumo de oxigénio máxima (q_{O_2}) encontrada na literatura e determinada experimentalmente, e valores da taxa de transferência de oxigénio para cada valor de pressão (Biorreactor Whitey de 1 L)

		$OUR_{m\acute{a}x}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	
Referência	q_{O_2} ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Concentração celular inicial ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	
		0.5	10
Weusthuis <i>et al.</i> , 1994	80	40	800
van Urk <i>et al.</i> , 1989	211	106	2112
Experimental	108 ⁺	54	1084
Pressão (bar)	1.2	3.0	6.0
OTR ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	261.5 ± 65	541.6 ± 44	1113.6 ± 91

⁺ Este valor de foi determinado experimentalmente num biorreactor à pressão atmosférica acoplado com uma sonda de oxigénio e um registador em linha, cuja resposta é automática, adquirida e gravada em computador.

No entanto, analisando os valores de OUR e de OTR para a concentração de biomassa de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ verifica-se que com esta concentração de células a carência de oxigénio é sempre superior à taxa de transferência de oxigénio no meio de cultura. Assim, de forma a investigar o efeito da pressão no crescimento celular sob ausência de excesso de oxigénio ou mesmo insuficiência de oxigenação, repetiram-se os mesmos ensaios variando apenas a concentração inicial de biomassa para $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Os resultados obtidos nesta série de ensaios estão representados na Figura 5.6. Em todas as experiências o consumo da sacarose foi total ao fim de 22 h. A principal diferença entre as várias experiências realizadas reside nos valores máximos de concentração de biomassa e de etanol obtidos.

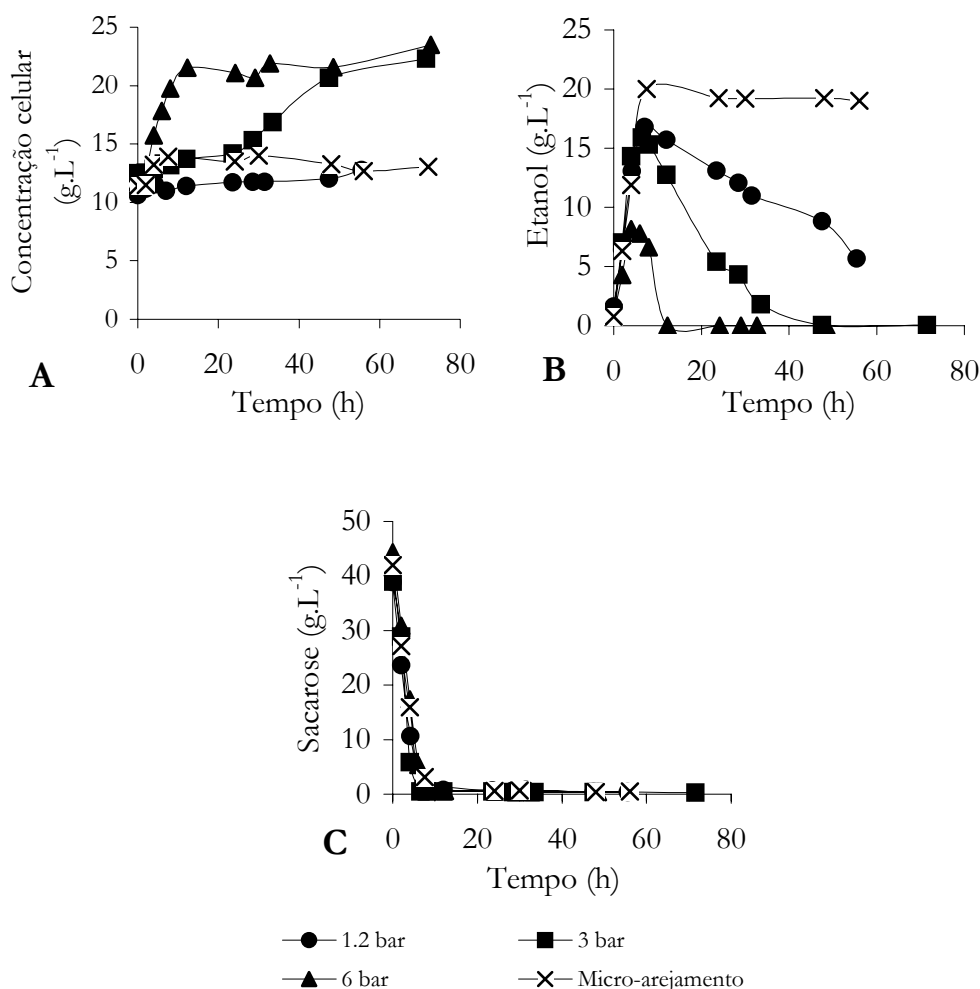


Figura 5.6 Variação da biomassa (A), etanol (B) e sacarose (C) ao longo do tempo de fermentação, com 1.2 bar, 3 bar e 6 bar de pressão de ar e com micro-arejamento, no biorreactor Whitey de 1 L, com uma concentração inicial de sacarose de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e com uma concentração de biomassa inicial de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Com o incremento da pressão de ar, aumentou a concentração de biomassa máxima atingida, e baixou a concentração de etanol produzida. Isto é, de 1.2 bar até 6.0 bar a concentração celular aumentou cerca de 1.8 vezes, e a concentração de etanol diminuiu cerca de 2 vezes. O etanol produzido foi imediatamente consumido após o total consumo da sacarose. O aumento da pressão também aumentou o metabolismo oxidativo do etanol, aliás, no ensaio com 6.0 bar de ar o etanol foi totalmente metabolizado. Pelo contrário, em condições de micro-

arejamento, o etanol não foi metabolizado pelas células permanecendo inalterável até ao final da experiência. Talvez a elevada concentração de etanol produzida, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, seja inibidora do crescimento, e/ou a elevada limitação de oxigénio no meio de cultura não permitisse a respiração celular.

Nesta série de experiências, obteve-se para o ensaio com 6.0 bar de ar, o máximo de produtividade em biomassa às 24 h, $383 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, enquanto que com 1.2 bar de ar a produtividade foi bastante menor, $46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, obtendo-se um valor intermédio de $72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, para 3 bar de ar.

Assim, concluiu-se que, o aumento da pressão parcial de oxigénio, para valores superiores às necessidades das células, é prejudicial à actividade celular. Pelo contrário, em condições de insuficiente oxigenação o aumento da pressão parcial de oxigénio induz a actividade oxidativa das células, melhorando o crescimento celular.

Com os resultados obtidos nos dois biorreactores hiperbáricos, mais uma vez se confirma que, o aumento da pressão total de ar aumenta a taxa de transferência de oxigénio no meio de cultura a qual por sua vez conduz ao aumento do rendimento em biomassa, à aceleração da taxa de crescimento, e à diminuição da produção de etanol, predominado o metabolismo oxidativo.

A diferença encontrada entre os resultados obtidos nos dois biorreactores hiperbáricos reside na diferença entre os valores de *OTR* para cada um dos deles. Através das Figura 5.2 e Figura 5.7 podem ser observadas as diferenças significativas entre os valores da taxa de transferência de oxigénio obtidos nos biorreactores Parr e Whitey, respectivamente. Para o valor de pressão de 6 bar de ar a taxa de transferência de oxigénio é 1.6 vezes maior no biorreactor Parr. Esta diferença encontrada poderá ser explicada pelo maior tempo de residência dos gás durante a sua ascensão pelo biorreactor Parr e também pela diferente forma de agitação.

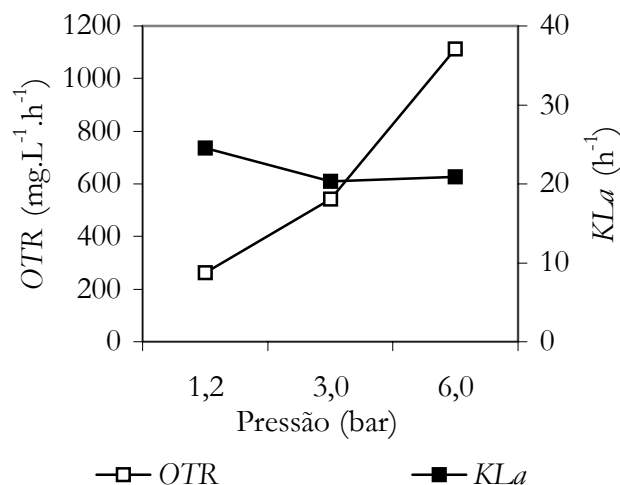


Figura 5.7 O efeito da pressão na taxa de transferência de oxigênio (OTR) e no coeficiente global volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) no biorreator Whitey de 1L.

5.3.2 Ensaios em semi-contínuo

Com as experiências realizadas em descontínuo concluiu-se que em culturas de elevada densidade celular a aplicação da pressão de ar favorecia a produção em biomassa relativamente à produção em etanol. Desta forma, e para conseguir elevadas produtividades, operou-se em semi-contínuo, aplicando a pressão elevada como forma de tentar melhorar a taxa de transferência de oxigênio num meio de cultura com elevada densidade celular.

Para tal realizaram-se ensaios no biorreator Parr em semi-contínuo, variando a pressão de ar entre 1 bar, 6 bar e 12 bar. O meio de cultura com 100 g·L⁻¹ de sacarose era alimentado a uma taxa de diluição constante e igual a 0.025 h⁻¹. A concentração de biomassa inicial foi de 15 g·L⁻¹. Também se realizou um ensaio com 5 g·L⁻¹, com 6 bar de pressão total ar nas mesmas condições operacionais com o objectivo de compará-la com as restantes. Na Figura 5.8 encontram-se resumidos os resultados obtidos representativos da concentração celular, etanol e sacarose ao longo do tempo do ensaio.

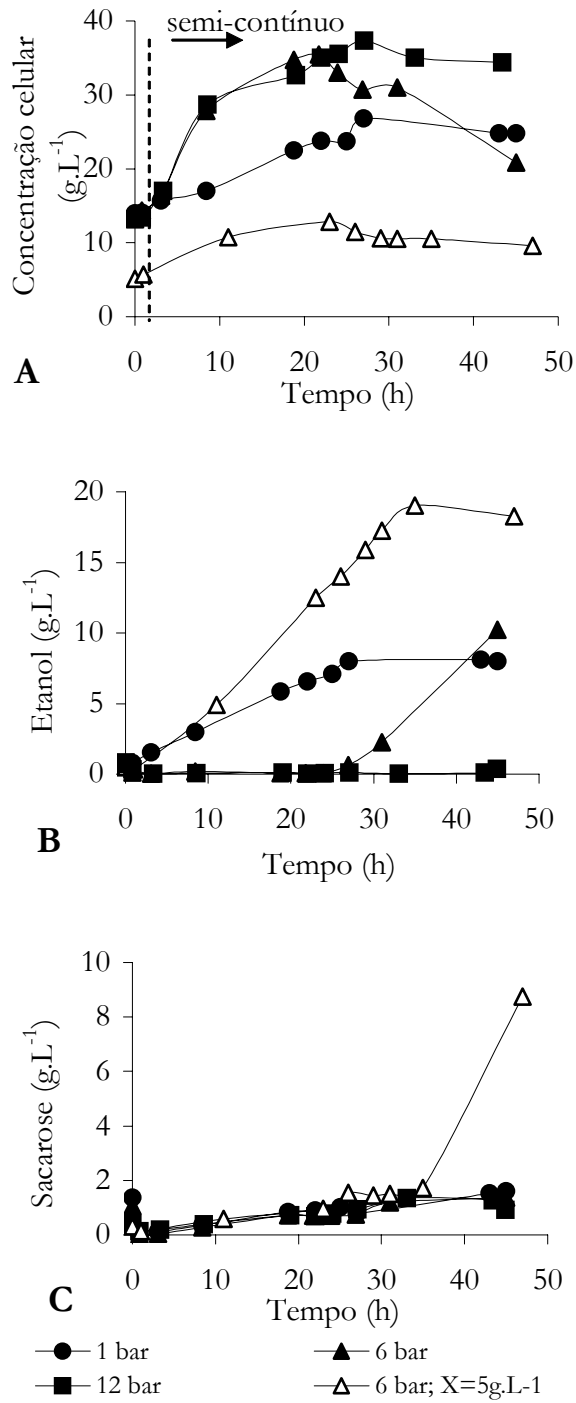


Figura 5.8 Variação da biomassa (A), etanol (B) e sacarose (C) ao longo do tempo de fermentação em semi-contínuo para as experiências realizadas no biorreactor Parr, com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar, com D igual a 0.025 h^{-1} e com 100 g.L^{-1} de sacarose na alimentação. Símbolos pretos: 15 g.L^{-1} e Símbolos brancos: 5 g.L^{-1} de concentração celular inicial.

Os ensaios em semi-contínuo foram iniciados após 1h de operação em descontínuo, com $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarose.

Quando a concentração celular na fase de arranque do ensaio é menor do que nas restantes experiências, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, a concentração celular final produzida é relativamente baixa, $12.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, em relação à elevada concentração de etanol produzido, $19.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Concentração esta, que se torna inibidora do crescimento a partir das 35 h, tempo a partir do qual não se observa crescimento, nem consumo de substrato. De facto a concentração de sacarose aumenta após atingir-se o máximo em etanol. Neste ensaio predomina o metabolismo fermentativo.

No entanto, quando a concentração inicial de biomassa é de $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, nas mesmas condições, o comportamento da levedura difere do anterior. À medida que a pressão de ar aumenta, a concentração celular aumenta e a concentração máxima de etanol diminui. As curvas de crescimento das experiências com 6 bar e 12 bar de ar são coincidentes até 24 h decorridas após o arranque do ensaio. No entanto, a partir deste tempo, com 6 bar de ar, as células de levedura começam a fermentar a sacarose alimentada, e como consequência, a concentração celular diminui e a concentração de etanol aumenta. Ao contrário, quando se aumenta a pressão de ar para 12 bar, a concentração celular não diminui, mantendo-se constante até ao final da experiência, assim como não se observa formação de etanol.

Estes resultados permitem inferir que em culturas com uma concentração celular de $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, com um valor de pressão de ar de 6 bar, as células não têm oxigénio disponível suficiente para a sua actividade respiratória. Em contrapartida, com 12 bar de pressão de ar foi possível ultrapassar esta limitação, disponibilizando às células uma taxa de transferência de oxigénio suficiente ao seu crescimento.

A Figura 5.9 mostra a produtividade em biomassa ao longo do tempo, para os ensaios realizados.

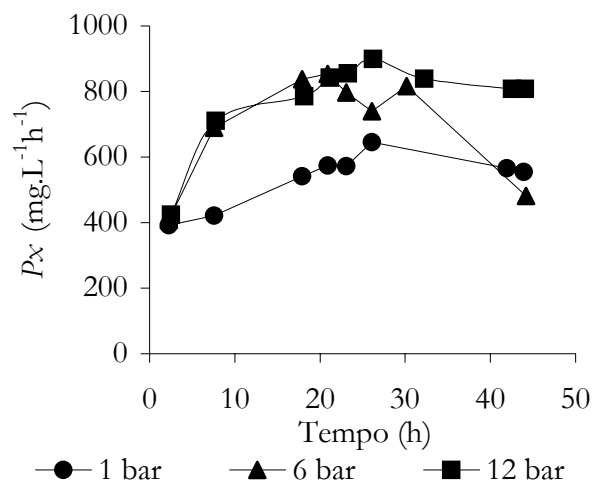


Figura 5.9 Variação da produtividade em biomassa ao longo do tempo de fermentação em semi-contínuo para os ensaios realizados no biorreactor Parr, com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar, para um perfil de alimentação a taxa de diluição constante e igual a 0.025 h^{-1} , com $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarose na alimentação e com $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de concentração celular inicial.

No ensaio com maior valor de pressão, 12 bar, atingiu-se uma produtividade máxima de $900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Este valor mantém-se até ao final do ensaio. Ao contrário, no ensaio com 6 bar de ar, a produtividade atinge um valor máximo de $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ às 30 h, para diminuir de seguida, para metade deste valor. Este facto pode ser explicado pela elevada concentração de biomassa, para a qual a taxa de transferência de oxigénio é insuficiente para as necessidades metabólicas da levedura. Da mesma forma, Belo *et al.* (2003) obtiveram, através do aumento da pressão de ar, até cerca de 10 bar de ar, um incremento da produtividade em biomassa em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, sem inibição da actividade metabólica.

Na Figura 5.10 encontram-se representados os valores da taxa específica de crescimento e da taxa de consumo de sacarose ao longo do tempo de operação para os três ensaios realizados a D constante. A taxa específica de crescimento diminui ao longo do tempo, em todos os ensaios realizados. Segundo Weusthuis *et al.* (1994), este decréscimo da taxa específica de crescimento poderá ser justificado através da existência de limitação de oxigénio no meio de cultura. De

facto, estes ensaios foram realizados com uma elevada densidade celular, tendo-se obtido no final do ensaio cerca de $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

De referir ainda que os ensaios foram realizados com D constante o que conduz ao decréscimo de q_s ao longo do tempo (Figura 5.10), pelo que, a diminuição da velocidade de crescimento poderá resultar também de uma limitação pelo substrato.

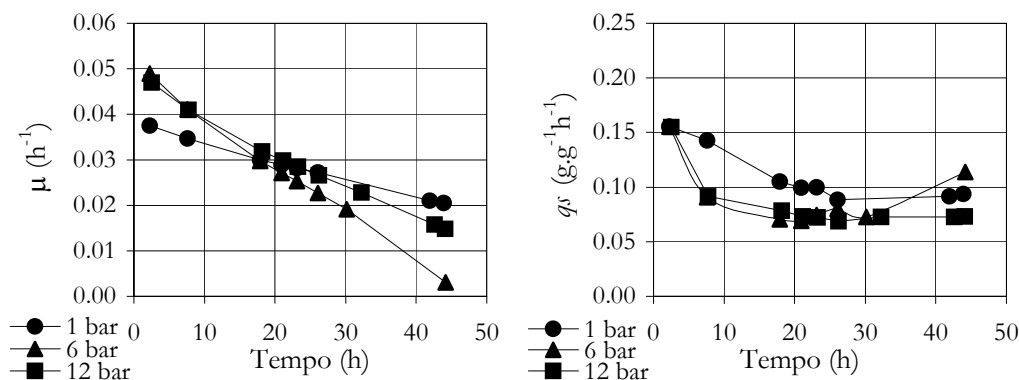


Figura 5.10 Comparação na evolução do tempo de fermentação em semi-contínuo para os ensaios realizados no biorreactor Parr da taxa específica de crescimento (μ) e da taxa específica de consumo de sacarose (q_s) para um perfil de alimentação a taxa de diluição constante e igual a 0.025 h^{-1} , com $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarose na alimentação, para as três pressões de ar estudadas (1 bar, 6 bar e 12 bar).

Com os resultados obtidos, pode concluir-se que, uma pressão de ar de 12 bar não inibe o crescimento das células em cultura semi-contínua, podendo ainda ser ensaiados valores de pressão superiores e com diferentes estratégias de alimentação.

5.3.3 Efeito do aumento da pressão na morfologia celular

Sabe-se que o desempenho de um biorreactor é bastante influenciado pelo carácter morfológico das leveduras no seu meio de crescimento. As propriedades reológicas do meio de cultura são influenciadas por diversos factores como a

concentração de células e a sua morfologia (Huls *et al.*, 1992; O'Shea e Walsh, 1996; Zalewski e Buchholz, 1996). Existem diversas formas de determinar e analisar a distribuição de tamanhos de uma população de células, que pode ser através de um contador electrónico de partículas, através de um citómetro de fluxo e também através de um microscópio. Estas análises reflectem propriedades celulares diferentes: um contador partículas electrónico analisa a resistência das células, um citómetro de fluxo, determina o conteúdo em proteína e ADN, e um microscópio fornece informações precisas acerca da forma e do tamanho das células (Huls *et al.*, 1992).

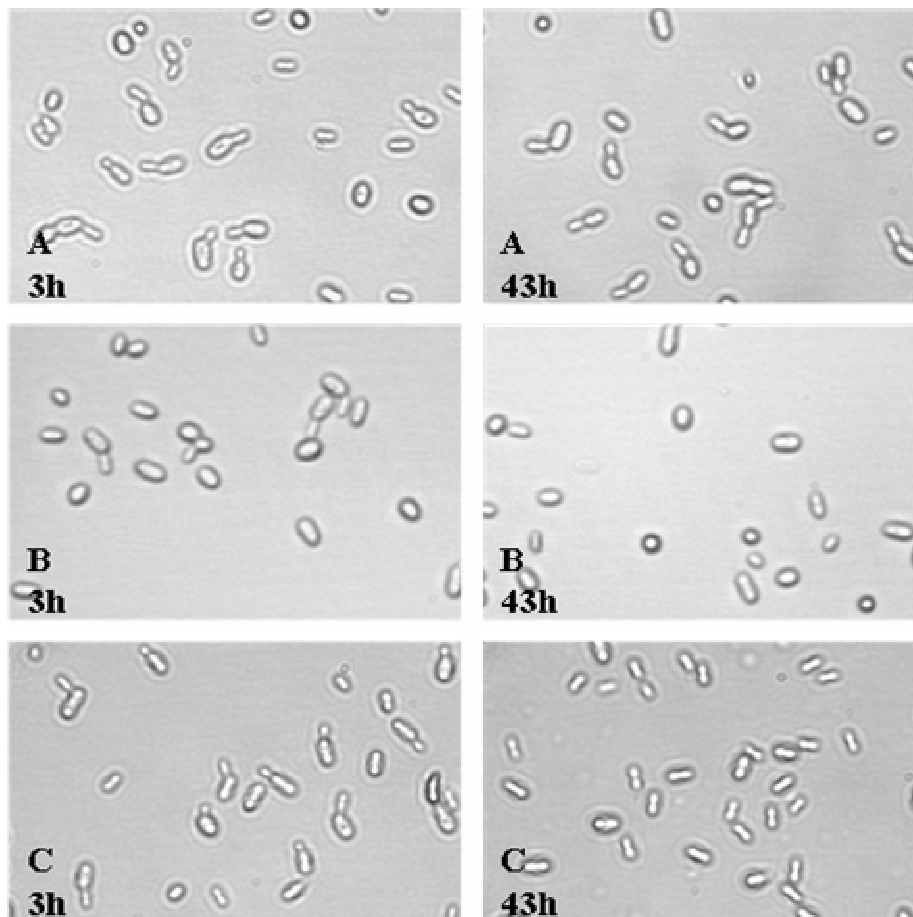


Figura 5.11 Microscopia de contraste de fase (Ampliação microscópica 400x). Alterações morfológicas na levedura *Candida utilis* CBS 621 em cultura semi-contínua. Amostras correspondentes aos tempos 3 h e 43h. (A) 1 bar de ar; (B) 6 bar de ar; (C) 12 bar de ar.

Neste trabalho utilizaram-se técnicas de análise de imagem para determinar alguns parâmetros de morfologia celular, de forma a obter informação adicional sobre o estado fisiológico da cultura. O acompanhamento de possíveis alterações morfológicas celulares revelou-se de extrema importância devido às elevadas pressões utilizadas. Ao longo do decorrer dos ensaios em semi-contínuo foram adquiridas várias imagens de amostras recolhidas às 3 h, 19 h e 43 h. Estas imagens após adquiridas foram processadas em Matlab (versão 6.1/windows, release 12.1, The Mathworks). Alguns exemplos dessas imagens são apresentados na Figura 5.11.

Numa primeira abordagem, as células foram classificadas em células simples e células a gemularem (Figura 5.12). A composição dos agregados celulares varia bastante com a fase de crescimento, *i.e.*, se se trata da fase estacionária ou exponencial (Zalewski e Buchholz, 1996). De facto, estes autores classificaram as células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em quatro classes, de acordo com as várias formas que estas apresentam durante o seu crescimento: pequena gémula, duas células a gemularem mas já com o mesmo tamanho, células simples com vacúolo grande, e as mais pequenas, células mortas. Da mesma forma, o conjunto das imagens captadas para a mesma amostra foi tratado e processado, obtendo-se resultados para a percentagem de células simples e para a percentagem de células gemulantes (Figura 5.12).

A partir da Figura 5.12 verifica-se que, logo após o arranque dos ensaios, 3 h, a percentagem de células simples diminui, de 90 % para cerca de 80 % a 70 %. Este resultado está de acordo com Zalewski e Buchholz (1996) e com Pons e Vivier (1998), pois segundo estes autores, uma característica de uma boa adaptação do inóculo à nova cultura é o rápido decréscimo da quantidade de células simples em cultura e o aumento da percentagem de células gemulantes.

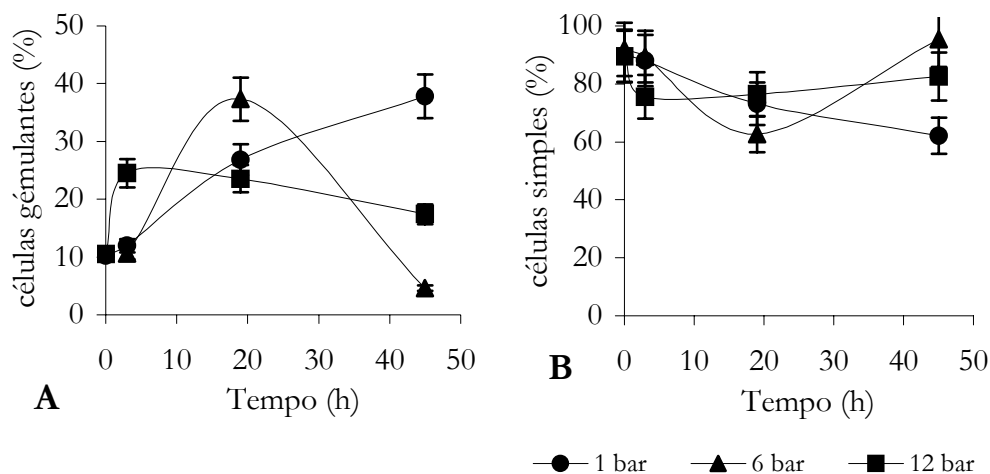


Figura 5.12 Variação da percentagem de células simples e de células gemulantes ao longo do tempo dos ensaios realizados em semi-contínuo, para as pressões de ar: 1 bar, 6 bar e 12 bar (valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança).

Na Figura 5.12, para os ensaios com pressão de 6 bar e de 12 bar, verifica-se que até às 20 h de operação, a percentagem de células gemulantes é dominante, contrabalançando com a diminuição da percentagem de células simples. Por outro lado, após este período de tempo, verifica-se um aumento de células simples e um decréscimo de células gemulantes. Este comportamento poderá ter como base a velocidade de crescimento, pois quando esta é maior observa-se um aumento da percentagem de células gemulantes. Pelo contrário, no ensaio realizado à pressão atmosférica (1 bar) a percentagem de células gemulantes aumenta e a percentagem de células simples diminui até ao final do ensaio. Este comportamento está de acordo com a curva de crescimento (Figura 5.8) e respectivos valores da taxa específica de crescimento (Figura 5.10) onde se observa que este ensaio apresenta valores finais de μ superiores aos dos restantes ensaios.

A Figura 5.13 mostra a frequência de distribuição de tamanhos, área, das células de levedura ao longo do tempo de ensaio.

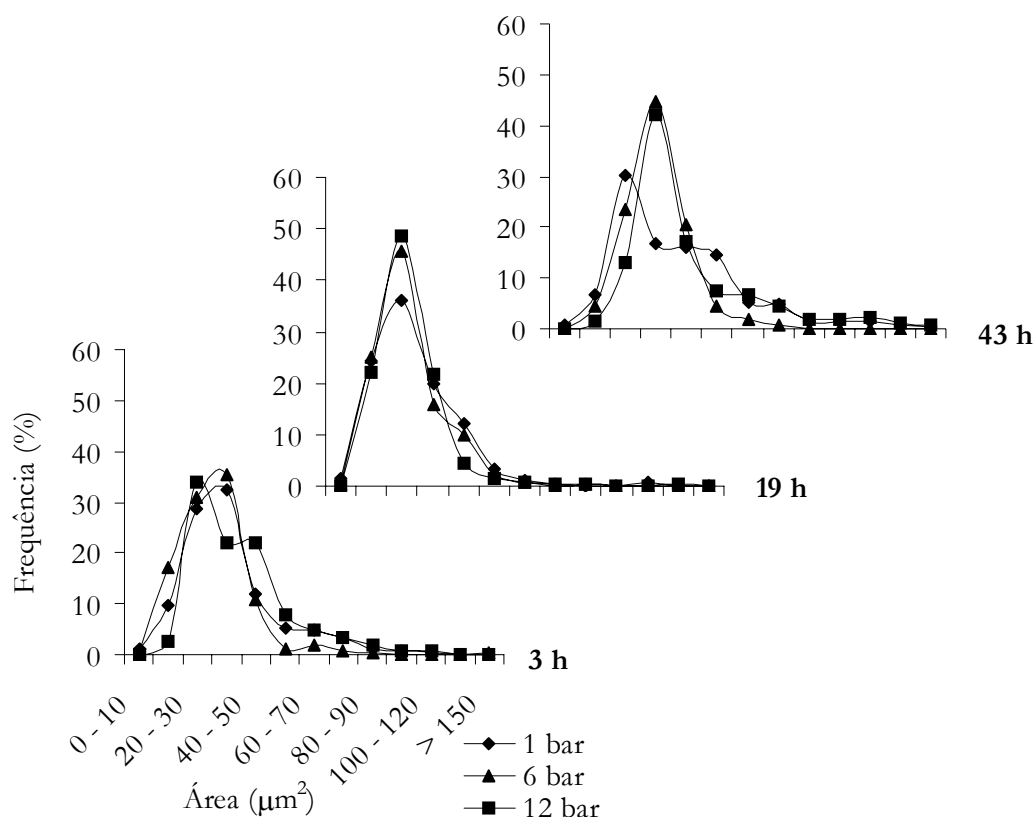


Figura 5.13 Distribuição da frequência de tamanhos, área, das células de levedura *Candida utilis* CBS 621, ao longo do tempo dos ensaios decorridos com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar.

A determinação do tamanho das células pode dar informações acerca do estado fisiológico da cultura, como por exemplo da viabilidade celular, pois as células consideradas não viáveis são mais pequenas do que as células viáveis (Thomas e Paul, 1996). As curvas da Figura 5.13 foram ajustadas a um comportamento de Gauss e os valores médios da área obtida para cada ensaio encontram-se na Tabela 5.5.

Após 3 horas do arranque dos ensaios, as curvas das três experiências (1 bar, 6 bar e 12 bar) são praticamente coincidentes, e a maior parte das células de levedura, tendo uma área de, aproximadamente, $30 \mu\text{m}^2$. Nesta fase de crescimento não se observam células com área superior a $70 \mu\text{m}^2$. Não se

detectam diferenças significativas nos valores médios da área das células entre os ensaios realizados com diferentes pressões de ar ao longo do tempo. A área média das células no final dos ensaios é de $27 \mu\text{m}^2$ e $36 \mu\text{m}^2$, para os ensaios com 1 bar e 12 bar, respectivamente.

Tabela 5.5 Parâmetros de tamanho (Área) e circularidade ($F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$) para a levedura *Candida utilis* CBS 621 ao longo do tempo dos ensaios decorridos com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar (valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança)

Pressão ar (bar)	Área (μm^2)			$F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$		
	3 h	19 h	43 h	3 h	19 h	43 h
1	31.0 ± 0.6	24.7 ± 3.4	27.4 ± 1.4	1.59 ± 0.02	1.66 ± 0.05	1.26 ± 0.02
6	29.6 ± 0.8	23.8 ± 1.0	34.5 ± 0.2	1.60 ± 0.02	1.83 ± 0.02	1.55 ± 0.04
12	31.4 ± 2.3	25.1 ± 0.3	35.8 ± 0.6	1.64 ± 0.03	1.78 ± 0.05	1.67 ± 0.04

A partir destes resultados pode concluir-se que, nas condições de operação utilizadas na produção em semi-contínuo de células de levedura *Candida utilis* CBS 7894, não se observam alterações no tamanho das células, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os ensaios realizados com pressão total de ar até 12 bar e o ensaio com pressão atmosférica. Os valores encontrados estão dentro da gama de valores descritos na literatura para as células de levedura *Candida utilis*, que pode variar entre $24 \mu\text{m}^2$ e $60 \mu\text{m}^2$ (Phaff, 1985).

Outro parâmetro morfológico que também foi analisado foi a circularidade ($F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$) das células de levedura *Candida utilis* CBS 621 (Figura 5.14).

Na Figura 5.14 verifica-se que as curvas podem ser ajustadas a uma distribuição de Gauss traduzindo-se num valor médio respeitante à esfericidade das células de cada ensaio (Tabela 5.5). Na primeira amostra (3 h) verifica-se que

a maior percentagem de células tem esfericidade média de 1.6, aproximadamente igual para os três ensaios. Como este valor é superior à unidade, conclui-se que as células desta estirpe são alongadas, tipicamente ovais.

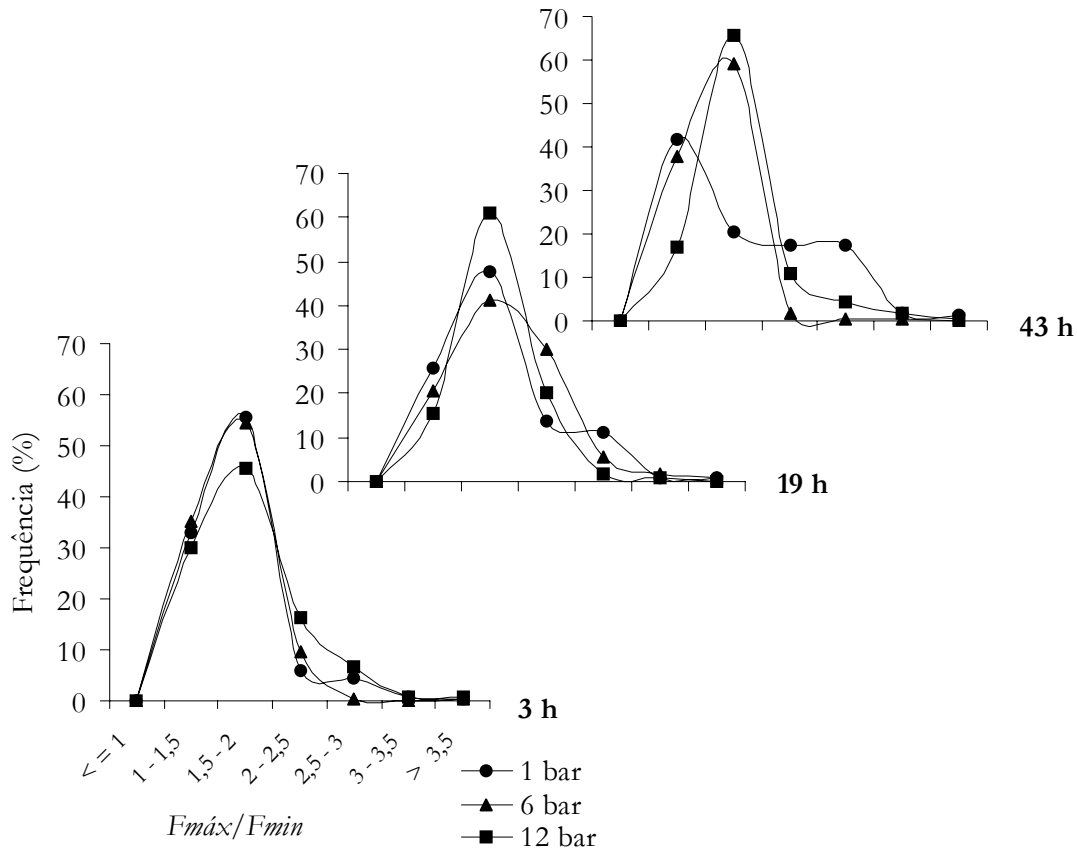


Figura 5.14 Distribuição da frequência de circularidade, F_{\max}/F_{\min} , das células de levedura *Candida utilis* CBS 621, ao longo do tempo dos ensaios decorridos com 1 bar, 6 bar e 12 bar de pressão de ar.

Este parâmetro morfológico não sofre diferenças significativas ao longo do tempo dos ensaios. Nos ensaios realizados com 6 bar e 12 bar, as células apresentam um forma mais alongada devido às dimensões atingidas, 1.6 a 1.7, enquanto que no ensaio à pressão atmosférica, as células ficaram com uma forma mais arredondada, dada a gama de circularidade obtida, 1.26. Este facto poderá estar relacionado com o estado fisiológico da cultura, *i.e.*, neste último ensaio

encontra-se ainda um número elevado de células gemulantes, as quais possuem uma forma mais arredondada do que as células simples e mais velhas.

Com os resultados anteriormente descritos conclui-se que para a gama de pressões estudadas e para as condições de operação utilizadas, apesar de algumas diferenças no tamanho e na esfericidade, a morfologia da levedura *Candida utilis* CBS 621 não é significativamente afectada. Estes resultados vão de encontro aos que foram concluídos por Belo (1999) com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

5.4 Conclusões

O trabalho realizado com a levedura *Candida utilis* CBS 621 constituiu mais uma demonstração do efeito positivo do ar hiperbárico em culturas aeróbias. Este efeito revelou-se bastante vantajoso quando se utilizaram culturas de *Candida utilis* de elevada densidade celular, nas quais o oxigénio é um factor limitante do crescimento celular. Verificou-se que o efeito inibidor do oxigénio em excesso, devido ao aumento da pressão, observado com baixa densidade celular, foi ultrapassado com a utilização de culturas com maior concentração de células inicial, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, relativamente à concentração de $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

A aplicabilidade do ar hiperbárico foi também estudado em culturas de *Candida utilis* a operar em semi-contínuo. Concluiu-se que, a pressurização de culturas, com uma concentração celular de $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, até um valor de 6 bar, não disponibiliza às células oxigénio suficiente para a sua actividade respiratória. Em contrapartida, quando se utilizou uma pressão de ar de 12 bar foi possível ultrapassar esta limitação, e como consequência o metabolismo respiratório foi favorecido relativamente ao metabolismo fermentativo. O que leva a inferir que se poderia incrementar ainda mais o valor da pressão total de ar de forma a maximizar o crescimento celular.

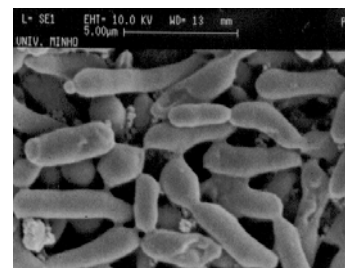
Os procedimentos de análise de imagem aplicados às células de levedura *Candida utilis* permitiram concluir que valores de pressão total de ar até 12 bar não afectam significativamente a morfologia das células, relativamente aos parâmetros estudados, células gemulantes e simples, circularidade e tamanho.

Capítulo 6

Resposta da levedura *Kluyveromyces marxianus* ao stresse oxidativo

“O desenvolvimento de estirpes industriais resistentes a diversas condições de stresse prossegue em associação com o esclarecimento dos mecanismos moleculares inerentes à resistência ao stresse.”

Costa e Moradas-Ferreira, 2003



Capítulo 6

Resposta da levedura *Kluyveromyces marxianus* ao stresse oxidativo

Sumário

Nas leveduras, tal como nos eucariotas superiores, são produzidas espécies reactivas de oxigénio (ERO) como sub-produtos do metabolismo celular. Em condições sub-letais as células desencadeiam mecanismos de defesa que evitam os danos moleculares. Este equilíbrio é perturbado quando as células são expostas a diversos agentes de stresse. O aumento da produção das espécies reactivas de oxigénio leva à indução de mecanismos de defesa, que é a resposta da célula ao stresse oxidativo.

Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito de vários agentes geradores de ERO, como o peróxido de hidrogénio, o paraquato, a pressão de ar e de oxigénio puro, na actividade das enzimas anti-oxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione reductase, em células de levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894. Estudou-se ainda a capacidade de adaptação das células à pressão de oxigénio puro, quando, previamente expostas a baixa pressão de ar durante a fase exponencial de crescimento.

Os resultados sugerem que esta estirpe é bastante tolerante às concentrações dos oxidantes químicos estudados. Pelo contrário, as células de levedura mostraram ser mais sensíveis ao aumento da pressão de oxigénio puro até 6 bar, e da pressão de ar até 10 bar, tendo-se verificado uma elevada indução da actividade da SOD e da GR, em relação aos níveis controlo. Foram ainda estudados os efeitos destes valores de pressão na morfologia das células.

Concluiu-se que o pré-tratamento das células com um valor baixo de pressão de ar levou a uma indução da capacidade de resposta das células ao aumento da pressão de oxigénio puro. Ao contrário, quando se utilizou oxigénio hiperbárico, sem pré-tratamento, as células não foram capazes de se adaptarem a pressões superiores ou iguais a 4.0 bar de oxigénio puro.

6.1 Introdução	186
6.2 Material e Métodos	201
6.3 Resultados e discussão	207
6.4 Conclusões	233

6.1 Introdução

6.1.1 Breve referência Histórica

Lavoisier, em 1789, foi o primeiro cientista a reconhecer e a estudar a função do oxigénio nos organismos vivos. Um século depois, Fenton publica um artigo que impulsiona o trabalho sistemático sobre a produção das espécies reactivas de oxigénio (ERO) assim como, os seus efeitos na célula (Becker e Schirmer, 1995).

A implicação das espécies reactivas de oxigénio em processos biológicos, tais como o envelhecimento, foi proposta há mais de três décadas, tendo contudo a maior parte dos bioquímicos ignorado a sua importância durante muitos anos (Nagy, 1989). Mesmo assim, McCord e Fridovich (1969) afirmaram que a formação de ERO fazia parte integral do metabolismo das células. Mesmo após a descoberta da superóxido dismutase, que possibilitou um maior conhecimento do efeito das ERO em sistemas biológicos, ainda hoje alguns bioquímicos argumentam contra a função destas moléculas, devido à baixa concentração dos respectivos radicais nos sistemas vivos.

Pode concluir-se, a partir dos dados existentes actualmente, que há formação de ERO nos sistemas biológicos, e que aqueles estão envolvidos em muitos fenómenos biológicos tais como envelhecimento, mutagénese, inflamação, e outras patologias (Nagy, 1989).

6.1.2 Resposta geral ao stresse

A sobrevivência das células está dependente da sua capacidade para detectar as alterações das condições ambientais e responder a novas situações. As alterações das condições químicas ou físicas da célula que são negativas para o crescimento exigem uma resposta rápida por parte da célula. Os mecanismos moleculares que são induzidos são designados de resposta ao stresse imposto pelas várias

condições adversas. Estas condições adversas podem ter diversas proveniências, tal como esquematizado na Figura 6.1. Podem ser condições ambientais, como a temperatura de crescimento, a falta de substrato ou outro nutriente essencial ao crescimento, a presença de iões metálicos, de oxidantes químicos (Mager e Hohmann, 1997) ou o aumento da pressão parcial ou total de oxigénio (Farr e Kogoma, 1991).

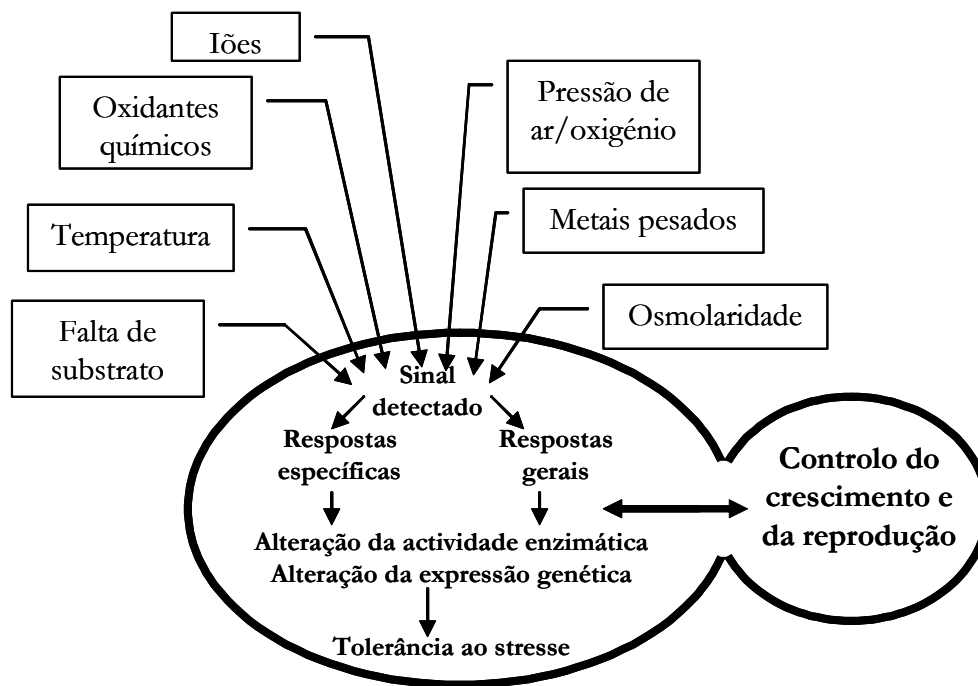


Figura 6.1 A célula de levedura detecta os vários tipos de stress e são desencadeadas respostas específicas e gerais a estas condições de stress impostas à célula. Estas respostas resultam em alterações tanto ao nível enzimático como ao nível da expressão genética e levam à aquisição de tolerância ao stress imposto. O controlo do stress tem um papel fundamental na regulação do crescimento celular (segundo Mager e Hohmann, 1997).

Os mecanismos da resposta ao stress têm como função principal proteger as células contra os efeitos negativos do stress e reparar qualquer dano molecular. Desta forma, a resposta ao stress leva a ajustes no metabolismo e noutros processos celulares. De acordo com a sua importância biológica, a resposta ao stress pode resultar na reparação dos danos celulares, mas também induz a aquisição de tolerância ao stress imposto às células, através de mecanismos que previnem a ocorrência de danos celulares (Figura 6.1) (Mager e Hohmann, 1997).

As proteínas de stresse foram descritas pela primeira vez em 1961 por Ritossa em células de glândulas salivares de *Drosophila*, depois de expostas a 37 °C durante 30 min, produzindo um aumento da síntese de proteínas com baixo peso molecular (70 kDa a 26 kDa). Estas proteínas foram designadas de proteínas de choque térmico (Hsps) (Rodríguez e López, 2003). No entanto, a temperatura não é o único agente de stresse que pode induzir a síntese de Hsp, por exemplo, o aumento da concentração de etanol (stresse etanólico) pode também induzir o aumento deste tipo de proteínas em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, assim como, a adição de sais (stresse osmótico), a adição de peróxido de hidrogénio (stresse oxidativo) (Mager e Moradas-Ferreira, 1993).

As proteínas de choque térmico, que são sintetizadas em diferentes organismos quando submetidos a um agente de stresse, têm algumas semelhanças entre elas. Algumas famílias de Hsp podem ser divididas em diferentes grupos conforme o seu peso molecular, Hsp100 (Hsp104 em *Saccharomyces cerevisiae*), Hsp90 (Hsp83 em *Saccharomyces cerevisiae*), Hsp70, Hps60 e as pequenas Hsps (Hps30, Hps26, Hps12 em *Saccharomyces cerevisiae*). Estas proteínas estão envolvidas em diversos processos relacionados com o crescimento, como a divisão celular, a replicação do ADN, etc. (Mager e Moradas-Ferreira, 1993; Mager e Kruijff, 1995).

A indução das proteínas de stresse resulta de um aumento da transcrição dos respectivos genes, sendo a transcrição regulada por diferentes factores de transactivação envolvidos na resposta ao stresse (Costa e Moradas-Ferreira, 2003).

6.1.3 Stresse oxidativo

Segundo Santoro e Thiele (1997), stresse oxidativo é o termo genérico para designar todo o tipo de stresse associado às células ou organismos que detectam, respondem e protegem-se das espécies reactivas de oxigénio.

Com o grande desenvolvimento dos estudos acerca das espécies reactivas de oxigénio nos últimos anos, o fenómeno do stresse oxidativo tem sido alvo de muitas investigações (Gille e Sigler, 1995). Este fenómeno pode ser definido como uma perturbação do balanço de pro-oxidantes e anti-oxidantes a favor dos pro-oxidantes, que pode ser causador de danos celulares (Sies, 1986). Este desequilíbrio pode resultar de uma diminuição dos anti-oxidantes, devido ao esgotamento de tais defesas, de um aumento da produção das ERO, ou de ambos (Moradas-Ferreira *et al.*, 1996; Costa e Moradas-Ferreira, 2001).

6.1.3.1 Espécies reactivas de oxigénio

O termo, radical livre de oxigénio, é normalmente usado para todas as espécies reactivas de oxigénio (ERO) incluindo aquelas que não são radicais. É importante referir que as formas de oxigénio não radicais, por exemplo hidroperóxidos orgânicos (ROOH), são também reactivas. Assim, espécies reactivas de oxigénio, é o termo mais correcto para designar este tipo de composto (Gille e Sigler, 1995).

Embora qualquer espécie reactiva de oxigénio possa provocar danos nas células, são os radicais hidróxilo os grandes responsáveis pelos maiores efeitos nocivos. Qualquer aumento de radicais superóxido, de peróxido de hidrogénio, ou de iões metálicos activos (ex. cobre e ferro) origina o aparecimento de radicais hidróxilo altamente reactivos. As espécies reactivas de oxigénio, juntamente com outras moléculas, podem gerar o aparecimento de outros radicais de oxigénio, como é o caso do radical peróxilo nos lípidos. A acumulação destas moléculas está também directamente relacionada com a morte celular (Costa e Moradas-Ferreira, 2001).

As espécies reactivas de oxigénio são moléculas altamente instáveis que têm um ou mais electrões desemparelhados. A maior parte das ERO incluem o singlete de oxigénio ($^1\text{O}_2$), o anião superóxido (O_2^-), o radical hidróxilo ($\cdot\text{OH}$), o

peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e os radicais peróxido (ROOH , RO_2^\cdot) (Figura 6.2 A).

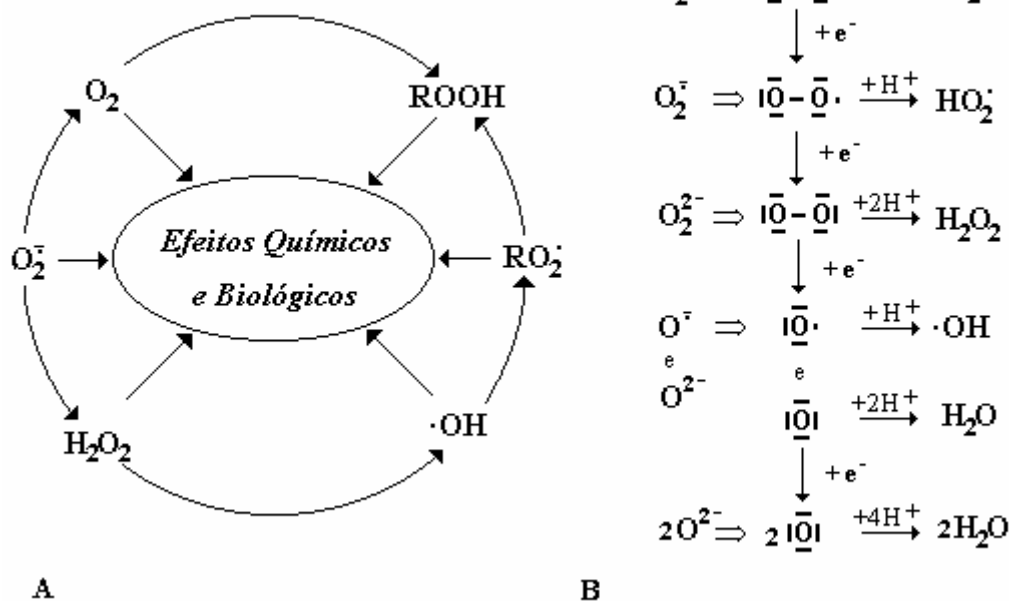


Figura 6.2 (A) Interconversão das espécies reactivas de oxigénio nos sistemas químicos e biológicos (Adaptado de Singh, 1989); (B) Activação da molécula de O_2 (Gille e Sigler, 1995).

Para o oxigénio participar em reacções de oxidação, primeiro tem que ser activado por um processo físico (fotodinâmico), que leva à formação do singlete de oxigénio, ou através da redução da molécula de oxigénio com um electrão (Figura 6.2 B). A transferência de mais do que um electrão para o radical superóxido traduz-se em ião peróxido, com a transferência de mais um electrão e de um protão forma-se o radical hidróxilo (Gille e Sigler, 1995).

6.1.3.1.1 O radical superóxido

O radical superóxido é a espécie reactiva de oxigénio mais abundante na natureza. Na natureza este radical é gerado através de uma grande variedade de processos que ocorrem em condições aeróbias. Este radical pode ainda ser gerado através da auto-oxidação, via interacções com redutores celulares (ex. glutathione e NADH) e através da acção de agentes químicos, tal como o paraquato, menadiona, que são capazes de atravessar a membrana plasmática (Santoro e Thiele, 1997). Embora o $O_2^{\cdot-}$ tenha uma reactividade limitada em soluções aquosas, é muito importante que a sua eliminação seja rápida e eficiente, uma vez que este radical pode dar origem a mais espécies de oxigénio também prejudiciais à célula (Gille e Sigler, 1995). O $O_2^{\cdot-}$ *per se* pode não ter a reactividade suficiente para matar as células. No entanto, a sua dismutação espontânea, que origina peróxido de hidrogénio, leva à formação de radicais hidróxilo, carregados de elevada reactividade (Farr e Kogoma, 1991).

6.1.3.1.2 O peróxido de hidrogénio

Tal como mencionado anteriormente, todos os sistemas que produzem $O_2^{\cdot-}$ também originam H_2O_2 . Estas reacções, não enzimáticas, ou catalisadas pela enzima superóxido dismutase, são a principal fonte de H_2O_2 *in vivo*. Tal como o radical superóxido, também a molécula de peróxido de hidrogénio pode servir como agente de oxidação e de redução, e a sua reactividade é fortemente limitada em soluções aquosas. Pode penetrar nas membranas biológicas causando, deste modo, danos às células, induzindo a formação de radicais. O H_2O_2 pode inactivar algumas enzimas tais como a gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase, oxidando também alguns ácidos, como o piruvato e o glioxilato (Gille e Sigler, 1995).

Embora o peróxido de hidrogénio seja um oxidante fraco, a sua toxicidade advém, principalmente, da conversão do H_2O_2 e do $O_2^{\cdot-}$ num radical altamente reactivo, o radical hidróxilo, na presença de pequenas quantidades de metais de

transição tais como o ferro ou o cobre, que estão presentes nas células (Meneghini e Martins, 1993).



A equação 6.1 representa a reacção de Fenton que origina radicais hidróxilo, capazes de reagir com quase todas as moléculas orgânicas em meio aquoso. Devido à sua elevada reactividade, não há protecção enzimática ou qualquer outro tipo de protecção contra a acção deste radical, a não ser a contínua substituição dos componentes das células danificadas (Nagy, 1989).

6.1.3.2 Os danos causados pelas ERO

São muitos os danos causados pelas espécies reactivas do oxigénio e a sua participação em muitos processos patológicos. São diversos os efeitos do stresse oxidativo e podem diferir de célula para célula (Gille e Sigler, 1995), governando deste modo a taxa de diferenciação e a taxa de envelhecimento dos organismos (Miquel, 1989).

Pensa-se que as espécies reactivas do oxigénio contribuem para o envelhecimento, cancro (Miquel *et al.*, 1989) e outros processos degenerativos, tais como problemas cardiovasculares e inflamatórios, devido a mutações e lesões causadas no ADN (Ames e Shigenaga, 1993), assim como danos na mitocôndria, devido aos elevados níveis de oxigénio que utiliza (Miquel, 1989).

Segundo Costa e Moradas-Ferreira (2003) a teoria da influência das espécies reactivas de oxigénio no envelhecimento de células, sugere a existência de uma correlação entre a longevidade e as defesas anti-oxidantes. De acordo com estes autores, em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a importância das defesas anti-oxidantes na eliminação de ERO, durante o envelhecimento de células em fase estacionária, é demonstrada pela diminuição do tempo de vida observado em mutantes deficientes em superóxido dismutase citosólica e mitocondrial.

Um dos mecanismos induzidos pelas ERO que provoca danos membranares é a peroxidação lipídica, a qual reduz a actividade de algumas enzimas membranares e de outras proteínas, alterando ainda as propriedades físico-químicas da membrana celular (Figura 6.3) (Nagy, 1989; Santoro e Thiele, 1997).

Por exemplo, o radical superóxido é responsável pela oxidação de tióis, ascorbato, tocoferol, e catecolaminas (Fridovich, 1989), ataca as proteínas e reduz metais de transição em complexos metálicos (Farr e Kogoma, 1991).

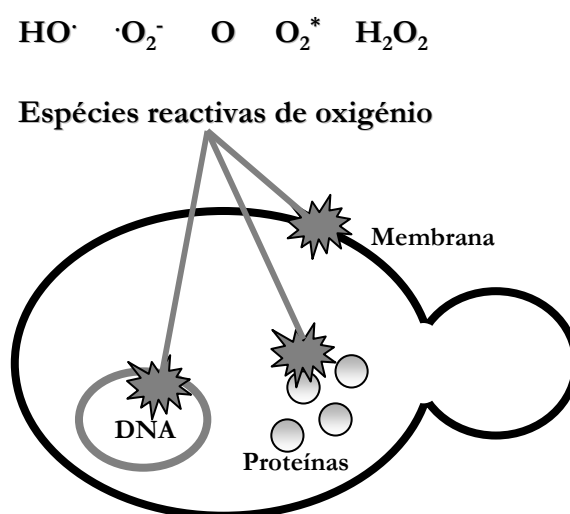


Figura 6.3 As espécies reactivas de oxigénio (ERO) provocam diversos danos celulares (Santoro e Thiele, 1997).

6.1.4 Mecanismos de defesa contra o stresse oxidativo

O aparecimento de ERO parece ser uma consequência incontornável da utilização do oxigénio pelos seres vivos. Estes desenvolveram meios de protecção específicos contra as ERO, indispensáveis à vida na presença de oxigénio. Os múltiplos mecanismos que têm lugar na luta contra o stresse oxidativo constituem um verdadeiro sistema anti-oxidante (Fraisie, 1993).

As defesas celulares contra os efeitos prejudiciais causados pelo stresse oxidativo dividem-se em duas classes, as de prevenção e as de reparação. A primeira classe tem como função a prevenção da ocorrência de danos oxidativos

através da destruição das ERO ou limitando a extensão de algumas reacções como é o caso da peroxidação lipídica. A classe de reparação é responsável pela reparação dos danos causados pelas ERO (Farr e Kogoma, 1991).

As defesas de prevenção envolvem componentes enzimáticos e não enzimáticos. Os componentes enzimáticos podem actuar removendo as espécies reactivas do oxigénio ou então actuam através da síntese de anti-oxidantes não enzimáticos (Farr e Kogoma, 1991; Lee *et al.*, 1993).

O crescimento das células em substratos respiratórios induz a expressão de genes que codificam as defesas anti-oxidantes (Tabela 6.1), compensando o aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio inerente ao metabolismo respiratório (Costa e Moradas-Ferreira, 2003).

Tabela 6.1 Algumas defesas anti-oxidantes das leveduras (Santoro e Thiele, 1997; Walker, 1998; Costa e Moradas-Ferreira, 2001)

Defesa enzimática ou química	Gene	Função
Enzimas		
Cu/Zn superóxido dismutase	<i>SOD1</i>	Dismutação do radical superóxido
Mn superóxido dismutase	<i>SOD2</i>	Dismutação do radical superóxido
Catalase A	<i>CTA1</i>	Decomposição do peróxido de hidrogénio
Catalase T	<i>CTT1</i>	Decomposição do peróxido de hidrogénio
Citocromo c peroxidase	<i>CCP1</i>	Redução do peróxido de hidrogénio
Glutathione reductase	<i>GLR1</i>	Redução da glutathione oxidada
Químicos		
Glutathione	<i>GSH1</i>	Captura de radicais de oxigénio
Metalotionina	<i>CUP1</i>	Captura de radicais superóxido ou hidróxil; ligação a Cu ²⁺ , prevenindo a ocorrência da reacção de Fenton
Tioredoxina	<i>TPX2</i>	Redução de proteínas, do peróxido de hidrogénio
Poliaminas	<i>SPE2</i>	Protecção dos lípidos da oxidação

Algumas defesas anti-oxidantes encontram-se normalmente presentes nas células, enquanto que outras são induzidas mediante resposta ao stresse oxidativo imposto (Tabela 6.1). A localização celular destas defesas tem uma importância fundamental na detecção, remoção e reparação dos danos causados pelas ERO (Santoro e Thiele, 1997).

6.1.4.1 Superóxido dismutase

Presentemente conhecem-se três tipos diferentes de superóxido dismutase (SOD), a superóxido dismutase de cobre-zinco (Cu/ZnSOD) que aparece no citoplasma de quase todos os eucariotas, e de alguns procariotas, sendo codificada pelo gene *SOD1*, a superóxido dismutase de manganésio (MnSOD), codificada pelo gene *SOD2*, encontra-se nos procariotas, e nas mitocôndrias dos eucariotas, e a superóxido dismutase de ferro (FeSOD) que existe predominantemente nos procariotas, mas também em alguns protozoários e plantas (Fridovich, 1989).

A superóxido dismutase tem uma função crucial na protecção das células contra as espécies reactivas do oxigénio, pois converte o radical superóxido em peróxido de hidrogénio. Esta reacção ocorre em duas etapas de acordo com o mecanismo da Figura 6.4.

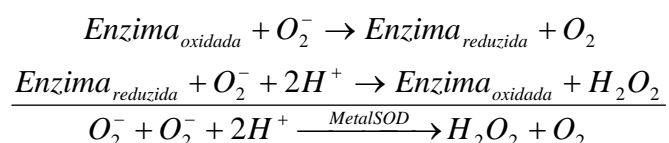


Figura 6.4 Representação esquemática da reacção catalisada pela SOD.

A superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) tem como tarefa a protecção da mitocôndria durante o crescimento aeróbio, através da eliminação do radical superóxido. Enquanto que, a superóxido dismutase cobre/zinco tem como função a eliminação dos radicais superóxido do citoplasma celular (Walker, 1998).

A localização distinta destas enzimas é determinante na sua função de protecção contra o stresse oxidativo.

A vasta literatura existente sobre a SOD mostra que esta enzima exerce um papel importante no mecanismo geral de protecção das células contra as ERO. Por exemplo, células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes em MnSOD demonstram ter uma sensibilidade excessiva ao oxigénio (van Loon *et al.*, 1986; Clarkson *et al.*, 1991). Alguns estudos mostram que a actividade da SOD aumenta na presença de geradores de radicais superóxido, como o paraquato (Lee e Hassan, 1985; Kim *et al.*, 1995) ou através do aumento da pressão de oxigénio (Gregory *et al.*, 1974). Esta indução é uma evidência da importância desta enzima como defesa anti-oxidante. Segundo o trabalho de revisão de Gille e Sigler (1995), existem vários estudos em que se verificou que o aumento da actividade da SOD não causou aumento da resistência às condições de stresse impostas à célula, o que demonstra que, embora a SOD tenha uma importância fundamental na protecção contra o oxigénio, não é a base de todo o processo anti-oxidante.

6.1.4.2 Catalase

O peróxido de hidrogénio pode ser eliminado pelas peroxidases e pelas catalases. A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do peróxido de hidrogénio em oxigénio e água (Equação 6.2). Nas células que contêm as duas enzimas, são provavelmente as peroxidases, localizadas nos mesmos organelos que a enzima SOD e com mais afinidade para com o H_2O_2 , que asseguram a degradação do peróxido de hidrogénio, em caso de uma situação de stresse oxidativo (Fraisie, 1993).



São conhecidos dois tipos diferentes de catalases na levedura *Saccharomyces cerevisiae*: a citosólica, codificada pelo gene *CTT1*, e a peroxissomal, codificada

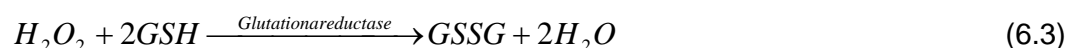
pelo gene *CTA1* (Santoro e Thiele, 1997). Segundo Schnell *et al.* (1992) estas catalases são reprimidas com elevadas concentrações de glucose. A eliminação do peróxido de hidrogénio pela catalase está limitada à formação de H_2O_2 nos peroxissomas por várias oxidases, mas também depende de outros factores como a fase de crescimento e a taxa específica de crescimento (Verduyn *et al.*, 1991).

6.1.4.3 *Glutathione reductase*

Para além da catalase, existem outras peroxidases que são igualmente responsáveis pela defesa das células contra o peróxido de hidrogénio. A glutathione e o seu ciclo constituem um exemplo de uma outra defesa anti-oxidante mas que não é enzimática.

A glutathione é um composto de tiol que tem como função a protecção das células contra radicais livres oxidantes. A glutathione pode ser encontrada nos microrganismos, plantas e animais sendo responsável pela captura dos radicais de oxigénio e actuando de forma a manter o equilíbrio redox nas células de levedura (Walker, 1998).

A redução da glutathione oxidada (GSSG) a glutathione reduzida (GSH), é efectuada através da glutathione reductase que é NADPH dependente (Gille e Sigler, 1995) de acordo com a seguinte reacção:



A glutathione reductase permitiu a sobrevivência dos grupos SH durante a evolução da vida aeróbia quando o oxigénio atmosférico alterou o equilíbrio químico entre tióis e outras formas de enxofre. Para além desta função, a glutathione reductase protege as células do stresse oxidativo através da redução rápida da glutathione oxidada (Becker *et al.*, 1996).

Mutantes de células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em glutathione mostraram elevada hipersensibilidade ao peróxido de hidrogénio (Izawa *et al.*, 1995) e ao radical superóxido (Stephen e Jamieson, 1996).

6.1.4.4 Aplicação prática dos anti-oxidantes

O estudo dos anti-oxidantes teve a sua primeira aplicação prática no uso da hidroquinona, adicionada em pequenas quantidades, para a prevenção da explosão espontânea de detonadores. Os anti-oxidantes têm também utilidade industrial na preservação de alimentos, uma vez que estas substâncias previnem a rancidez, que envolve a produção de lipoperóxidos. Esta investigação levou à descoberta de que os alimentos gordos estão naturalmente protegidos com anti-oxidantes (Miquel, 1989).

As enzimas anti-oxidantes podem ser usadas como biomarcadores do stresse oxidativo associado ao impacto ambiental, nomeadamente na detecção de peixe proveniente de zonas litorais poluídas (Winston e Giulio, 1991).

Tanto o envelhecimento celular como as doenças degenerativas, tais como a doença de Alzheimer, a artrite e o cancro são resultado das agressões das ERO nos tecidos humanos. Existem formas naturais de prevenção deste tipo de doenças, de forma a neutralizar os radicais livres de oxigénio e os seus efeitos, como por exemplo, a utilização de alimentos anti-oxidantes. Estes são ricos em substâncias que actuam nos radicais livres para que estes não provoquem danos membranares, no núcleo e no ADN das células. Alguns exemplos destes alimentos são as uvas, ricas em vitamina C, as sementes de girassol, ricas em vitamina E e bioflavonóides, o chá verde, rico em polifenóis e o tomate-cereja, rico em licopeno. Em alternativa, existem no mercado produtos que substituem os alimentos em termos de efeito anti-oxidante, uma vez que são à base de um concentrado enzimático de glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase, entre outros.

Ainda em relação ao envelhecimento, as ERO são responsáveis pelo surgimento de rugas, flacidez e perda da vitalidade da pele. As indústrias da área cosmética têm uma variada gama de produtos que visam a renovação celular. Na sua constituição, estes produtos cosméticos contêm anti-oxidantes como a glutatona, a vitamina A, a vitamina E, lecitina vegetal, alfa-hidroxiácidos e ceramidas.

6.1.5 A levedura como modelo para o estudo do stresse oxidativo

As leveduras têm consideráveis semelhanças com as células dos mamíferos tanto ao nível das macromoléculas como também ao nível dos organelos e inclusivamente, algumas proteínas mostraram ter funcionalidade permutável com proteínas humanas homólogas. Desta forma, compreende-se que se utilizem as células de levedura como modelo, com contribuições relevantes para o conhecimento dos mecanismos moleculares que intervêm na resistência ao stresse oxidativo (Costa e Moradas-Ferreira, 2001).

Durante os anos mais recentes, as leveduras, em especial a *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido alvo de muitos estudos e têm contribuído para um melhor conhecimento do papel desempenhado pelas ERO em doenças que estão relacionadas com o stresse oxidativo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é um microrganismo eucariota com 60 cromossomas e um genoma mitocondrial e cujo ADN já foi completamente sequenciado (Santoro e Thiele, 1997). A sequenciação do genoma permite a rápida identificação dos genes, a comparação entre estirpes, a identificação de proteínas homólogas, entre uma grande variedade de outras aplicações.

A capacidade que as leveduras têm para crescer em condições aeróbias, na qual a respiração é a principal fonte de energia, ou em condições anaeróbias, faz destes organismos excelentes modelos experimentais para o estudo do stresse oxidativo. De facto, a cadeia respiratória, que se localiza na mitocôndria, é a maior fonte geradora de espécies reactivas de oxigénio. Neste processo respiratório, cerca de

85 % a 90 % do oxigénio é consumido pelas células (Santoro e Thiele, 1997; Costa e Moradas-Ferreira, 2001).

O conhecimento alargado dos mecanismos de adaptação e de tolerância a factores ambientais causadores de stresse, apresenta, além do interesse inequívoco do ponto de vista fundamental, um potencial interesse biotecnológico, abrindo novas perspectivas de utilização de condições operatórias mais abrangentes. As estirpes de levedura ideais para fins industriais serão pois, as que possuem características de resistência e de adaptação a ambientes de stresse desfavoráveis, mantendo uma actividade celular elevada (Costa e Moradas-Ferreira, 2003).

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Microrganismo e manutenção

Nestes ensaios foi utilizada a estirpe *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894.

A estirpe foi mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, em tubos criogénicos específicos (Microbank, Pro-Lab Diagnostics). A reactivação das células foi feita em meio sólido com composição semelhante à do meio líquido, com adição de $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar, em caixa de Petri. As colónias obtidas após incubação a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas foram utilizadas para repicar tubos de agar inclinado. Estes foram mantidos no frigorífico a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2.2 Meios e condições de cultura

Para obter o inóculo de cada ensaio utilizaram-se tubos inclinados para inocular meio de cultura em matraz. A cultura de inóculo obtida foi incubada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a 150 rpm durante cerca de 24 h, numa incubadora orbital (Certomat®WR-B.Braun). O meio de cultura semi-sintético utilizado tinha a composição apresentada na Tabela 6.2. Todos os constituintes do meio de cultura foram dissolvidos em tampão fosfato de potássio, 0.2 M , pH 5.5. O pH foi ajustado a 5.5 antes da esterilização em autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 6.2 Composição do meio de cultura de *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894

Composto	Marca	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
KH_2PO_4	BDH	5.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck	1.2
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck	0.4
Extracto de levedura	Merck	1.0
Lactose	Merck	10

Preparação do tampão fosfato de potássio, 0.2 M, pH 5.5

Dissolve-se 13.6 g de KH_2PO_4 com 36 mL de NaOH , 0.2 M
Perfaz-se a 1000 mL com água destilada
Ajusta-se a pH 5.5

6.2.3 Condições de operação

Todos os ensaios deste capítulo foram realizados no biorreactor Whitey de 0.3 L, a operar em cultura descontínua. Os ensaios foram realizados após a carga do reactor com 150 mL de meio previamente inoculado com 15 mL. O meio de cultura do inóculo continha $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de lactose e foi inoculado com células de levedura provenientes de 2 tubos inclinados. Fixaram-se as condições de operação, temperatura, 30 °C, agitação, 150 rpm e taxa de arejamento de 1 vvm. A pressão de ar variou com o ensaio de acordo com a Figura 6.5.

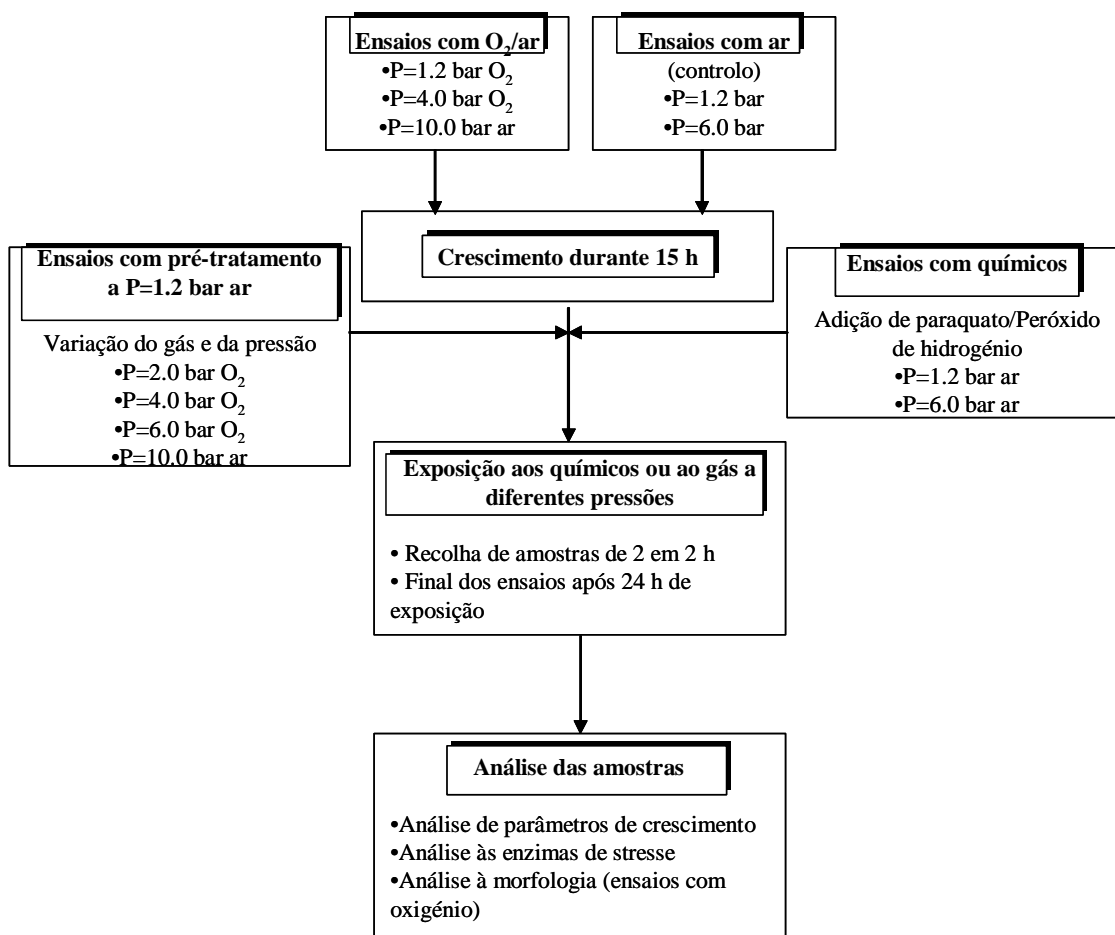


Figura 6.5 Ensaio realizado para estudar o efeito de vários agentes indutores de stresse oxidativo na levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894.

Como o objectivo deste capítulo foi estudar o efeito de vários agentes indutores de stresse oxidativo, seleccionaram-se dois químicos, o peróxido de hidrogénio e o paraquato, comparando-se o seu efeito com o efeito da pressão de ar e de oxigénio puro. Os ensaios realizados nesta etapa do trabalho encontram-se resumidos na Figura 6.5.

6.2.3.1 Ensaios com e sem adição de oxidantes químicos

O reaktor é carregado com o meio de cultura e com o inóculo e após seleccionar a pressão e ajustá-la no manómetro, inicia-se o ensaio. Retira-se a primeira amostra (amostra 0) e deixa-se que o ensaio decorra durante 15 h para que as células de levedura atinjam a fase exponencial, a qual corresponde a uma concentração em biomassa de 3.5 g·L⁻¹. Logo após este período de crescimento, retira-se nova amostra e introduz-se o químico para que no volume final de cultura fique uma concentração de 1 mM de paraquato e de 50 mM de peróxido de hidrogénio. Retiram-se amostras de 2 h em 2 h, durante mais 24 h. Estes ensaios são repetidos para 2 pressões diferentes (1.2 e 6.0 bar de ar) para cada um dos químicos estudados.

As concentrações dos químicos utilizados, foram seleccionadas, tendo como base trabalhos de outros autores (Izawa *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1995) e ensaios realizados em matraz. Nestes ensaios utilizaram-se várias concentrações de químicos, entre 2 mM e 100 mM, e entre 0.02 mM e 1 mM, de peróxido de hidrogénio e paraquato, respectivamente. A partir dos resultados obtidos nestes ensaios seleccionaram-se as maiores concentrações não letais.

Foram realizados ensaios sem adição de oxidantes químicos (ensaio controlo) para comparação com os ensaios nos quais estes oxidantes foram estudados. Estes ensaios em branco foram realizados exactamente da mesma forma que os anteriores mas sem a adição destes agentes de stresse após as 15 h de crescimento celular.

6.2.3.2 Ensaaios com pressão de oxigénio puro

Neste conjunto de ensaios utilizou-se como agente indutor de stresse, a pressão de oxigénio puro em substituição do oxidante químico (Figura 6.5).

Carrega-se o reactor com o meio de cultura e selecciona-se a pressão de oxigénio através da manipulação da válvula ligada à garrafa de oxigénio puro, e o seu valor é visualizado no respectivo manómetro. O ensaio é iniciado e retira-se a primeira amostra. Após decorridas 15 h retira-se nova amostra e a última amostra é retirada após 24 h.

6.2.3.3 Ensaaios com pressão de oxigénio puro com pré-tratamento

Neste conjunto de ensaios utilizou-se como pré-tratamento das células de levedura um valor baixo de pressão de ar (Figura 6.5). Carrega-se o reactor com o meio de cultura e selecciona-se a pressão de ar para 1.2 bar. Retira-se a primeira amostra e deixa-se o ensaio decorrer durante 15 h. Logo após este período de tempo retira-se nova amostra e muda-se o gás de ar para oxigénio, alterando-se a pressão para o valor a ser estudado. Retiram-se amostras de 2 h em 2 h, durante mais 24 h.

6.2.4 Análise da morfologia por microscopia electrónica de varrimento

Com as técnicas de microscopia é possível aumentar o conhecimento sobre a organização espacial que ocorre nas células de microrganismos e sobre as respectivas superfícies. A microscopia electrónica de varrimento permite a visualização das estruturas complexas da superfície das células com elevada resolução (Surman *et al.*, 1996). De forma a preservar a estrutura celular sem que esta sofra alterações da sua forma inicial, as células têm que ser fixadas. Existem dois agentes fixantes que são os mais frequentemente utilizados: glutaraldeído e tetróxido de ósmio (Bozzola e Russell, 1992). No presente trabalho optou-se por utilizar o glutaraldeído.

Procedimento experimental

A amostra recolhida do biorreactor é lavada uma vez com excesso de tampão fosfato de potássio 0.1 M, pH 7.5. De seguida prepara-se um porta filtros com uma membrana de 0.2 μm de porosidade ligado a uma seringa. A amostra lavada é introduzida na seringa, e filtrada através do filtro de forma a permanecer fixa na membrana. Este procedimento é realizado com alguma precaução para não danificar as células. De seguida é adicionada a solução de glutaraldeído a 3 % (1 mL), agente fixante, que também é filtrada, e permanece a actuar durante 8 h. Após este tempo de exposição ao agente fixante, as células são lavadas três vezes com o tampão, ficando em contacto com esta solução durante, aproximadamente 12 h.

Segue-se o processo de desidratação com concentrações crescentes de etanol, as quais são filtradas, passando pela amostra. O etanol permanece em contacto com as células durante o período de tempo estipulado de acordo com a respectiva concentração a ser utilizada (Tabela 6.3). As duas últimas operações, com as concentrações mais elevadas de etanol, são realizadas duas vezes. Finalmente o filtro é retirado e acondicionado numa caixa de Petri, que por sua vez é colocada num exsiccador.

Tabela 6.3 Esquema do procedimento experimental para a preparação da amostra a ser analisada por microscopia electrónica de varrimento

Actividade	Químico	Tempo de exposição
Fixação primária	Fixação das células com glutaraldeído a 3 %	8 h
Lavagem	Tampão fosfato de potássio 0.1 M, pH 7.5	12 h
Desidratação	30 % etanol	5 min
	50 % etanol	5 min
	70 % etanol	15 min
	95 % etanol	15 min
	Etanol absoluto	30 min

Preparação do tampão fosfato de potássio, 0.1 M, pH 7.5

Dissolver 0.68 g de fosfato de potássio e 20.45 mL de hidróxido de sódio 0.1 M em 100 mL água destilada

Após preparação das amostras estas foram visualizadas através de um microscópio electrónico de varrimento (Leica, Cambridge S-360).

6.2.5 Monitorização

O efeito dos vários agentes geradores de espécies reactivas de oxigénio, como o peróxido de hidrogénio, paraquato e pressão de ar e de oxigénio no comportamento celular foi estudado em cada ensaio através da monitorização da variação, ao longo do tempo de operação, do crescimento celular, consumo de lactose, viabilidade celular e através da indução das enzimas anti-oxidantes. O método de análise da viabilidade celular que se utilizou neste capítulo foi a epifluorescência com alaranjado de acridina.

A actividade das enzimas anti-oxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione reductase, foi analisada nas amostras recolhidas após 1 h, 8 h e 24 h da adição do agente de stresse. O tempo total dos ensaios foi de 40 h, o qual corresponde à amostra recolhida depois de 24 h de exposição ao agente de stresse.

Recorreu-se ainda à técnica de análise de imagem para recolher informação sobre a morfologia das células de levedura ao longo do tempo de exposição à pressão de oxigénio puro. Foi determinada a área total das células e o parâmetro de alongamento (F_{max}/F_{min}).

Adicionalmente estudaram-se possíveis alterações morfológicas por aplicação da técnica de microscopia electrónica de varrimento, e tal como na técnica de análise de imagem, também aqui só foram analisadas as amostras tratadas com pressão de oxigénio puro.

6.3 Resultados e discussão

A apresentação e discussão sobre o efeito dos oxidantes, paraquato, peróxido de hidrogénio e pressão na levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, está dividida em três partes: no sub-capítulo 6.3.1, faz-se a análise da resposta da levedura aos oxidantes em relação ao metabolismo celular, no sub-capítulo 6.3.2 analisa-se a actividade das enzimas anti-oxidantes, e finalmente, no sub-capítulo 6.3.3, faz-se referência às alterações morfológicas nas células desta levedura.

6.3.1 Efeito dos oxidantes no metabolismo celular

6.3.1.1 Resposta ao paraquato e peróxido de hidrogénio

Foi estudado o efeito da pressão de ar na resposta ao stresse oxidativo causado pela exposição a oxidantes químicos como o paraquato e o peróxido de hidrogénio, com concentrações de 1 mM e 50 mM, respectivamente. As concentrações dos químicos utilizados foram seleccionadas tendo como base trabalhos de outros autores (Izawa *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1995).

Na Figura 6.6 estão representados os resultados obtidos na série de ensaios realizados com oxidantes químicos.

Durante a fase de crescimento exponencial de crescimento e após 15 h do arranque do ensaio adicionou-se paraquato até uma concentração final de 1 mM. O mesmo procedimento foi seguido nos ensaios com peróxido de hidrogénio com a concentração final de 50 mM. Estes ensaios foram realizados com duas pressões de ar distintas, 1.2 bar e 6.0 bar.

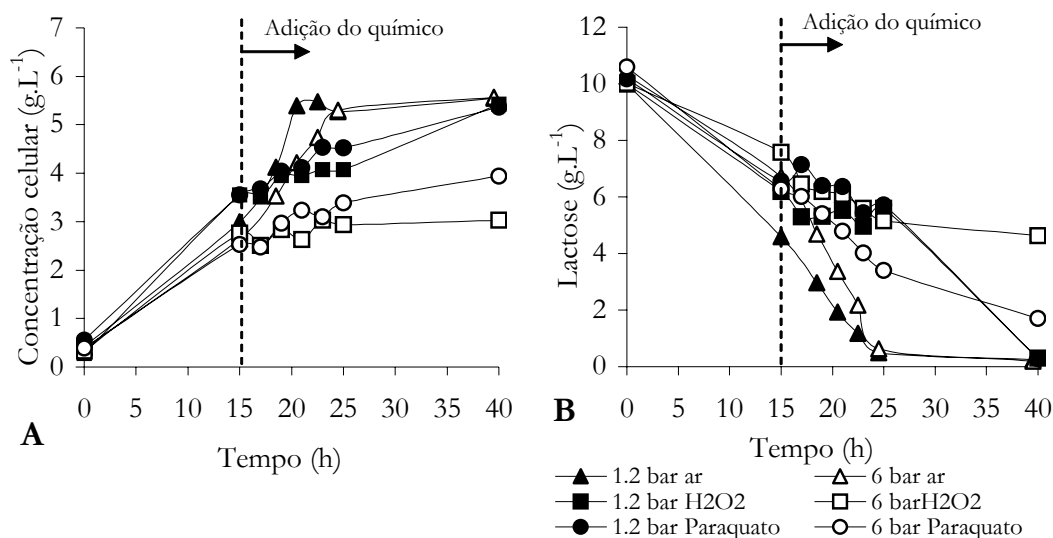


Figura 6.6 Variação da concentração celular (A) e da lactose (B) ao longo do tempo de exposição aos oxidantes químicos, paraquato (1 mM) e peróxido de hidrogénio (50mM) para 1.2 bar e 6.0 bar de ar. Os dois controlos realizados não tinham adição de químico.

Logo após a adição do químico ao meio de cultura verificou-se uma desaceleração do crescimento para ambos os químicos adicionados e para ambas as pressões estudadas. O crescimento celular é bastante semelhante na ausência de químicos, para 1.2 bar e 6.0 bar, registando-se uma taxa específica de crescimento de 0.13 h^{-1} e 0.12 h^{-1} , respectivamente. Isto demonstra a tolerância que as células de levedura têm para pressões até 6 bar de ar. O facto das células estarem sujeitas a uma possível condição de stresse, pressão de ar elevada, poderá afectar a sua tolerância para com outro tipo de indutor de ERO, o que poderá ser analisado não só pelo crescimento, mas também através da análise da actividade das enzimas anti-oxidantes (este assunto será discutido no sub-capítulo 6.3.2).

Apesar da desaceleração de crescimento verificada após a adição do químico, no caso de 1.2 bar de ar, as células retomaram o crescimento conseguindo no final do ensaio, após 40 h, atingir a mesma concentração celular das experiências controlo, 5.5 g.L^{-1} , para ambos os químicos. Ao contrário, quando se utilizou uma pressão de ar superior, 6.0 bar de ar, a fase de adaptação foi bastante mais longa, *i.e.*, as células apresentaram um crescimento extremamente lento (após a

adição dos químicos) e no caso do peróxido de hidrogénio não retomaram o crescimento. Facto este comprovado através do resultado obtido para o consumo da lactose. Pois, neste último caso a lactose deixou de ser consumida, enquanto que no caso do paraquato, ocorreu consumo, embora a uma taxa mais lenta do que nos ensaios de controlo. A concentração celular final foi cerca de metade da obtida com 1.2 bar de ar, para este último caso. Isto significa que as células responderam melhor ao paraquato do que ao peróxido de hidrogénio. Independentemente do agente químico, o seu efeito inibidor nas células foi ampliado pela pressão de 6 bar de ar. O que significa que, apesar das células tolerarem este valor de pressão podem já estar no seu limite de capacidade de defesa, pelo que, o aumento do nível de stresse por um agente químico traduz-se na inibição do crescimento celular.

Quando se analisa o comportamento da viabilidade celular ao longo do tempo dos ensaios (Figura 6.7), verifica-se que o decréscimo da viabilidade é bastante significativo para ambos os químicos. De facto, a viabilidade final é cerca de 70 % tanto para ambos os químicos, e para ambos os valores de pressão.

Estes resultados sugerem que esta estirpe é bastante tolerante às concentrações dos químicos estudados. No entanto, outras espécies como a *Schizosaccharomyces pombe*, após um tratamento com 40 mM de H_2O_2 , durante 1 h, apenas 10 % das células permanecem viáveis (Lee *et al.*, 1995). Segundo alguns autores (Janda *et al.*, 1993) a resistência demonstrada pela levedura *Schizosaccharomyces pombe* é em parte devido à não existência de peroxidação lipídica membranar, e também devido aos elevados níveis de glutathione reduzida que esta enzima sintetiza. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* também mostrou ser sensível a apenas 2 mM de H_2O_2 (Izawa *et al.*, 1995), assim como apenas 1 % de células de *Streptomyces coelicolor*, sobreviveram após exposição a 20 mM de H_2O_2 , durante 20 min (Lee *et al.*, 1993).

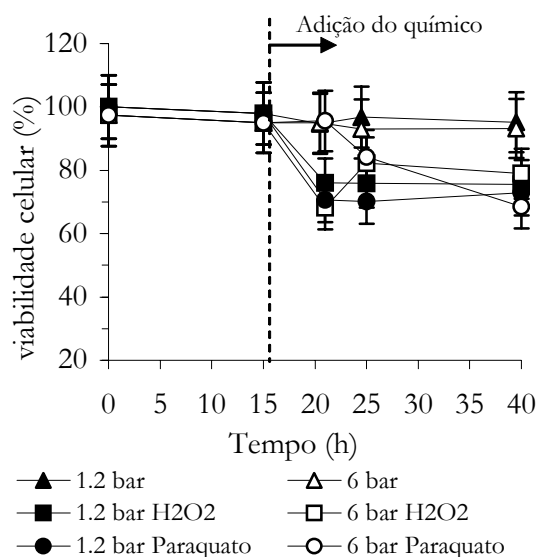


Figura 6.7 Variação da viabilidade celular ao longo do tempo de exposição aos oxidantes químicos, paraquato (1 mM) e peróxido de hidrogénio (50mM) para 1.2 bar e 6.0 bar de ar. Os dois controlos realizados, com 1.2 bar e 6 bar de ar não tinham adição de químico. São apresentados os valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança.

Por outro lado, o facto de se terem submetido as células de levedura *Kluyveromyces marxianus* a um crescimento prévio (15 h) sob condições de pressão de ar baixa, 1.2 bar, poderá ter induzido uma maior tolerância das células aos químicos adicionados. Este fenómeno designa-se de protecção cruzada, *i.e.*, a indução de um conjunto de defesas comuns que contribui para a protecção cruzada da célula (Costa e Moradas-Ferreira, 2003).

6.3.1.2 Resposta ao aumento da pressão de oxigénio puro e de ar

As células de levedura foram submetidas a várias pressões de oxigénio puro, (1.2 bar e 4.0 bar) e uma pressão de ar superior aos valores anteriores (10.0 bar) (Figura 6.8), desde o arranque dos ensaios. A partir destes resultados é possível verificar que a pressão de ar acima de 6.0 bar de ar, *i.e.*, 10.0 bar, começa a ter efeitos negativos no crescimento e no consumo de substrato.

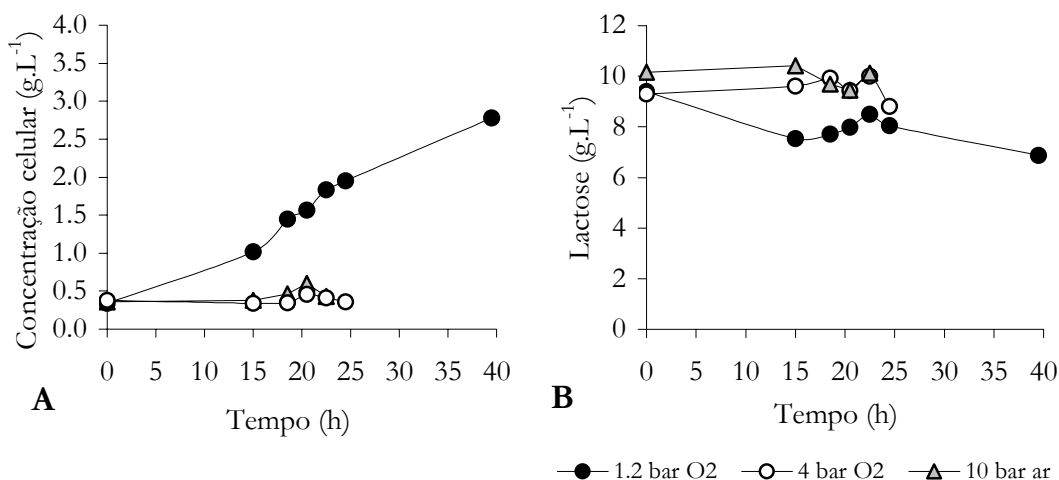


Figura 6.8 Variação da concentração celular (A) e da lactose (B) ao longo do tempo de exposição à pressão de oxigénio puro, 1.2 bar e 4.0 bar; e de ar, 10 bar.

O comportamento da levedura observado no ensaio com 10.0 bar de ar é semelhante ao do ensaio realizado com 4.0 bar de oxigénio puro, a que corresponderia uma pressão de cerca de 20 bar de ar. Neste ensaio não se verificou crescimento celular nem consumo de lactose. Ao contrário, com 1.2 bar de oxigénio puro, houve crescimento e consumo de lactose. Embora esta última pressão, 1.2 bar de O₂ puro, seja equivalente à pressão parcial de oxigénio em 6.0 bar de ar ($p_{O_2}=1.2$ bar) (Figura 6.6), o comportamento entre estes dois ensaios diferiu bastante. Esta diferença poderá ser explicada com base no fluxo molar de oxigénio introduzido no biorreactor, o qual, no caso do ensaio com 1.2 bar de oxigénio puro, foi cinco vezes superior, ao do ensaio com 6 bar de ar. Isto, porque se utilizou o mesmo caudal volúmico de gás em todos os ensaios. Assim, apesar da solubilidade de oxigénio ser a mesma em ambas as condições, a concentração de oxigénio dissolvida poderá ter estado sempre próxima deste valor máximo, no ensaio com oxigénio puro. Estes valores elevados de oxigénio dissolvido poderão ter sido prejudiciais à actividade celular.

Os resultados obtidos para a viabilidade celular (Figura 6.9) são uma confirmação do que se referiu anteriormente em relação ao efeito negativo do aumento da pressão de oxigénio puro.

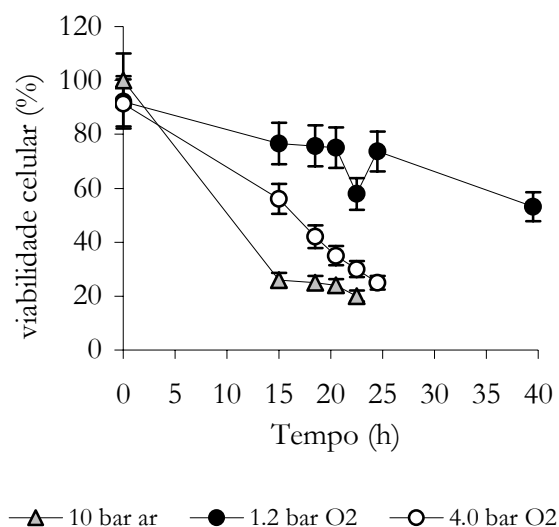


Figura 6.9 Variação da viabilidade celular ao longo do tempo de exposição à pressão de oxigénio puro, 1.2 bar e 4.0 bar, e de ar, 10 bar. São apresentados os valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança.

De acordo com a Figura 6.9, após 24 h do início dos ensaios a viabilidade celular diminuiu drasticamente, principalmente com 10 bar de ar e 4.0 bar de oxigénio puro, descendo até 20 % e 25 %, respectivamente.

A existência de células viáveis, ainda no final do ensaio, explica-se de acordo com o facto das células não apresentarem uma morte imediata após o aumento da concentração de oxigénio (Onken e Liefke, 1989). Uma das consequências é a desaceleração do seu crescimento ou até a paragem deste, sem no entanto morrerem. Normalmente as células encontram-se viáveis após prolongada exposição a pressões parciais de oxigénio elevadas e o tempo durante o qual ainda persistem células viáveis depende da espécie e do valor da pressão, que pode variar entre 24 h a 672 h (Onken e Liefke, 1989).

No final do ensaio com 1.2 bar de oxigénio puro apenas 53 % das células permaneceram viáveis, ao contrário da experiência com 6.0 bar de ar, na qual 93 % de células ainda estavam viáveis. Deve-se realçar o efeito negativo do gás e não do valor absoluto da pressão total.

6.3.1.3 Resposta ao aumento da pressão de oxigénio puro e de ar com pré-tratamento

Quando um organismo é tratado com uma dose sub-letal de uma condição de stresse (pré-tratamento) pode adquirir a capacidade de tolerar doses mais elevadas do mesmo agente de stresse. Adaptações semelhantes podem resultar a partir de tratamentos com agentes de stresse diferentes (Farr e Kogoma, 1991). De forma a averiguar a adaptação da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 a condições de sobrepressão de oxigénio puro e de ar, testou-se o efeito da pré-exposição das células a 1.2 bar de ar, na resistência à subsequente exposição a valores superiores de pressão de oxigénio puro e de ar.

Nas experiências referidas anteriormente, as células eram transferidas do matraz directamente para o biorreactor hiperbárico e a experiência era iniciada de imediato através da prévia regulação da pressão de ar ou oxigénio a ser estudada, e decorria durante 40 h. Desta forma, os resultados encontrados nas experiências com oxigénio puro ou até mesmo com ar poderiam estar influenciados pela transição directa de uma condição de micro-arejamento para um meio fortemente arejado. Assim, realizaram-se os ensaios cultivando as células previamente com uma pressão de ar baixa, 1.2 bar, e após 15 h do início da experiência, na fase exponencial, a pressão foi aumentada, permanecendo até ao final da experiência, 40 h. Repetiram-se as mesmas condições de pressão de ar: 10.0 bar e de oxigénio puro: 2.0 bar, 4.0 bar e 6.0 bar.

O pré-tratamento com 1.2 bar de ar induz nas células maior capacidade de crescimento a pressões de ar superiores (Figura 6.10). De facto, logo após a variação da pressão, de 1.2 bar de ar para 10 bar de ar, verifica-se a existência de

uma curta fase de latência (4 h), após a qual as células conseguem retomar o crescimento, atingindo-se no final uma concentração celular de $4.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Este crescimento celular é acompanhado pelo contínuo consumo de lactose ao longo do tempo.

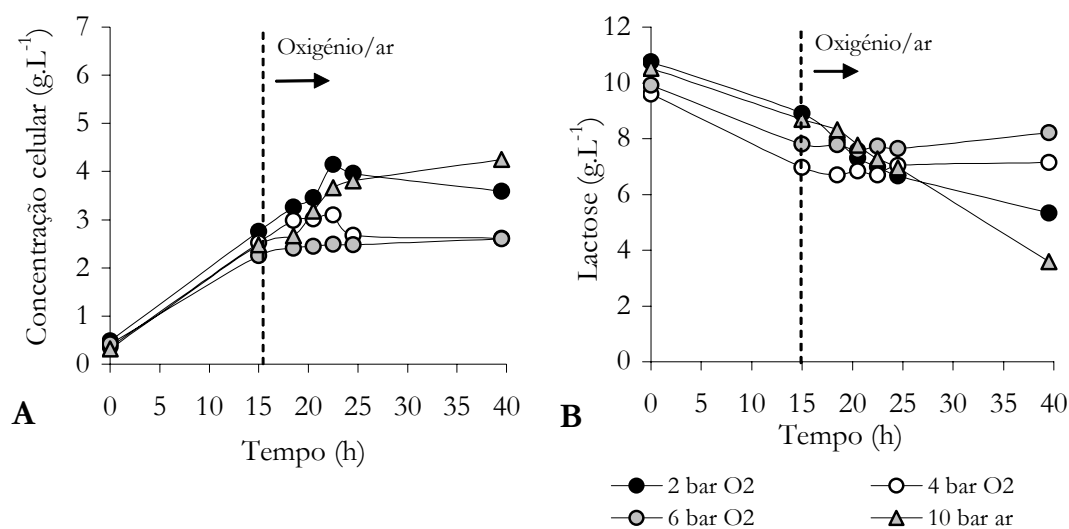


Figura 6.10 Variação da concentração celular (A) e da lactose (B) ao longo do tempo de exposição à pressão de oxigênio puro: 2.0 bar, 4.0 bar e 6 bar; e de ar: 10 bar. Nestes ensaios as células de levedura cresceram durante 15 h sob uma pressão de ar de 1.2 bar de ar, e foram depois submetidas a outra pressão de O_2 puro ou de ar.

O ensaio realizado com 2.0 bar de O_2 apresenta um comportamento bastante semelhante ao encontrado no ensaio com 10 bar. No entanto, quando se aumenta a pressão de oxigênio puro até 4 bar, apesar de um ligeiro aumento inicial, a concentração celular decresce logo após 9 h, verificando-se inibição do crescimento, e também diminuição da viabilidade celular (Figura 6.11). Este efeito inibidor é mais acentuado quando a pressão é aumentada até 6 bar de O_2 puro. O efeito inibidor da pressão de 4 bar de O_2 puro é visível também no consumo da lactose o qual cessa, e na viabilidade celular que diminui drasticamente até cerca de 40 %. Observa-se igual percentagem de viabilidade quando a pressão é de 6 bar de oxigênio puro.

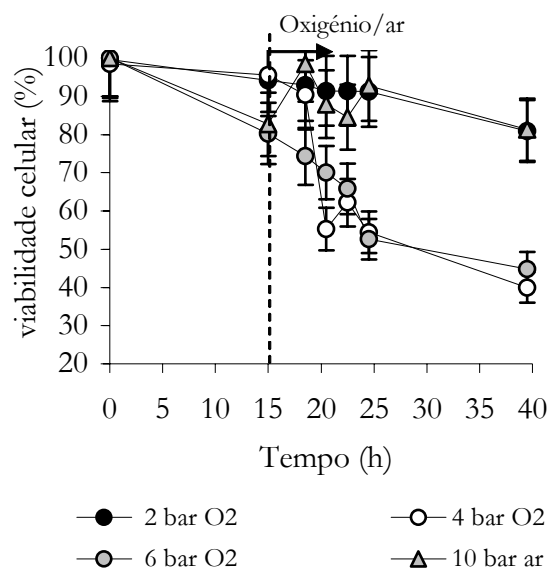


Figura 6.11 Variação da viabilidade celular ao longo do tempo de exposição à pressão de oxigênio puro: 2 bar, 4 bar e 6 bar; e de ar: 10 bar; após 15 h de pré-tratamento com 1.2 bar de ar. São apresentados os valores médios \pm intervalo com 95 % de confiança.

De facto quando se aumenta a pressão de oxigênio puro de 2.0 para 6.0 bar, a taxa específica de crescimento diminui (Figura 6.12).

Com os resultados obtidos, concluiu-se que o pré-tratamento com uma pressão de ar baixa, mostrou ser bastante positiva, quando comparada com os ensaios realizados sem pré-tratamento. As células foram capazes de crescer e utilizar o substrato, tolerando valores de pressão até 6 bar de oxigênio puro. Os resultados mais significativos dos ensaios com pré-tratamento foram obtidos com 2.0 bar de O₂ puro e com 10 bar de ar, o mesmo comportamento metabólico foi observado em ambos os ensaios, comprovando-se com valores de taxa específica de crescimento semelhantes (Figura 6.12).

Através da análise da Figura 6.12, é possível confirmar o efeito positivo do pré-tratamento. Por exemplo, no ensaio com 10 bar de ar, com pré-tratamento, a taxa específica de crescimento obtida foi cerca de 18 vezes superior à do ensaio sem pré-tratamento. O mesmo se aplica aos ensaios realizados com 4 bar de O₂ puro com e sem pré-tratamento. De facto para este último valor de pressão, no

ensaio sem pré-tratamento não foi observado crescimento celular, correspondendo a um valor nulo da taxa específica de crescimento. No entanto, este parâmetro aumentou para 0.034 h^{-1} quando se submeteram as células a pré-tratamento.

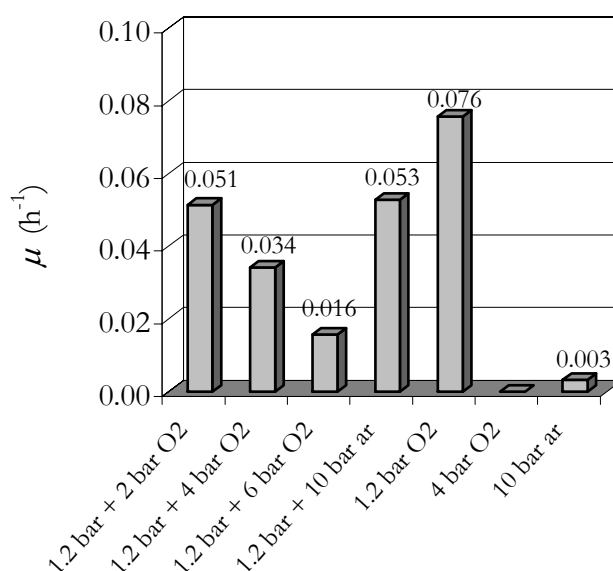


Figura 6.12 Valores da taxa específica de crescimento (μ) para cada um dos ensaios realizados com e sem pré-tratamento. Experiências realizadas sem pré-tratamento: 1.2 bar, 4.0 bar de oxigénio puro e 10 bar de ar. Experiências realizadas com pré-tratamento: 1.2 bar de ar + (2 bar, 4.0 bar e 6 bar de oxigénio puro e 10 bar de ar).

6.3.2 Efeito dos oxidantes na actividade das enzimas anti-oxidantes

A indução das enzimas anti-oxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione reductase (GR), mediante exposição a diversos oxidantes, pressão de ar e/ou oxigénio, paraquato e peróxido de hidrogénio foi também estudada. Os resultados dividem-se em duas partes conforme o tipo de oxidante gerador de ERO: químicos (peróxido de hidrogénio e paraquato) (Tabela 6.4) e pressão de oxigénio e de ar (Tabela 6.5).

6.3.2.1 Resposta ao paraquato e peróxido de hidrogénio

Nas experiências realizadas com paraquato ou com peróxido de hidrogénio, para ambas as pressões de ar, após 1 h de exposição, verificou-se uma forte indução da actividade da SOD (Tabela 6.4), em relação ao nível controlo (experiência sem adição de químico com 1.2 bar de ar).

Tabela 6.4 Actividade específica das enzimas anti-oxidantes, superóxido dismutase total (SOD), catalase (CAT) e glutathione reductase (GR), após 1 h, 8 h e 24 h de exposição aos químicos, paraquato (1 mM) e peróxido de hidrogénio (50 mM) sob duas condições de pressão: 1.2 bar e 6.0 bar de ar. Os níveis controlo foram considerados os que se obtiveram na experiência realizada com 1.2 bar de ar sem adição de químico (o desvio padrão não excedeu 10 %)

Químico	Pressão de ar (bar)	Tempo (h)	Actividade (U·mg ⁻¹)		
			SOD total	CAT	GR
Peróxido de hidrogénio	1.2	1	136.7	0.077	0.77
		8	109.7	0.040	0.56
		24	60.0	0.060	0.32
	6.0	1	152.2	0.058	1.10
		8	135.9	0.025	1.02
		24	138.2	0.016	1.05
Paraquato	1.2	1	211.6	0.027	0.81
		8	144.8	0.044	0.44
		24	119.9	0.056	0.40
	6.0	1	230.1	0.120	1.13
		8	136.6	0.050	0.59
		24	N.D.	0.032	0.74
Sem químico	1.2	1	71.9	0.066	0.48
		8	48.8	0.065	0.32
		24	36.6	0.064	0.29

N.D. – não disponível.

A actividade da SOD diminui ao longo do tempo de exposição a qualquer um dos químicos, sem no entanto atingir os níveis controlo. A actividade desta enzima aumentou cerca de 3 vezes no caso da exposição ao paraquato, e 2 vezes no caso da exposição ao peróxido de hidrogénio. Sendo a sua actividade maior

no caso dos ensaios com 6 bar de ar. O que está de acordo com o facto, de que a maior concentração de oxigénio no meio leva a uma maior indução de ERO. Assim, a acção de dois factores ambientais que incrementam a concentração de ERO no meio intracelular tem um efeito sinérgico na actividade da SOD. Mais uma vez se confirma a possível existência de uma protecção cruzada entre os dois agentes de stresse estudados. No entanto, a indução pelo químico, nomeadamente o paraquato, é superior à indução pelo aumento da pressão de 1.2 bar para 6.0 bar.

A maior indução da SOD pelo paraquato poderá explicar o maior crescimento celular obtido para as células expostas a este agente de stresse (Figura 6.6). Agius *et al.* (1998) também observaram elevados níveis de indução da SOD em células de *Saccharomyces cerevisiae* (clonadas com o gene da FeSOD de *E. coli*) mediante a exposição a 1 mM de paraquato. De facto a enzima SOD é extremamente sensível a agentes de stresse indutores de radicais superóxido como o paraquato. Também, Lee e Hassan (1985) verificaram elevados níveis de SOD em células de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de paraquato. Da mesma forma, Galiazzo e Labbe-Bois (1993) observaram aumentos de 50 a 100 % desta enzima na presença de 2.5 mM de paraquato, em células de *Saccharomyces cerevisiae*.

A enzima glutathiona reductase foi também induzida quer na presença de paraquato, quer na presença de peróxido de hidrogénio (Tabela 6.4). Esta indução foi mais significativa para o valor de pressão mais elevado, 6 bar, cerca de 2.4 vezes, e 1.7 vezes no caso de 1.2 bar de ar, por comparação com os níveis controlo. Lee *et al.* (1995) também observaram níveis elevados de GR em células de *Schizosaccharomyces pombe* após exposição ao peróxido de hidrogénio e paraquato, concluindo que este facto explica a grande resistência desta estirpe, aos oxidantes químicos.

Contrariamente ao observado para a SOD e para a GR, os níveis controlo da enzima catalase não se alteraram ao longo do tempo dos ensaios. Excepto no

ensaio com paraquato e com 6 bar de ar, após 1 h de exposição, a actividade da catalase aumentou cerca de 2 vezes em relação ao nível controlo. Estando de acordo com os resultados obtidos para a actividade da SOD e da GR. De facto foi o ensaio no qual as enzimas foram mais induzidas.

De uma maneira geral a actividade das enzimas CAT e SOD diminui ao longo do tempo de exposição aos agentes de stresse. Apesar de serem induzidas, os seus níveis decrescem ao longo do tempo, o que poderá estar relacionado com a fase e velocidade de crescimento das células.

A elevada indução verificada para a actividade da GR, em relação aos níveis controlo, poderá tornar desnecessária a indução da enzima catalase.

Os resultados sugerem que os agentes de stresse oxidativo estudados, paraquato e peróxido de hidrogénio, levam à indução das enzimas SOD e GR em detrimento da CAT, para esta estirpe de levedura. Segundo Izawa *et al.* (1995) a GR tem maior afinidade para o H_2O_2 do que a CAT, o que poderá explicar a insensibilidade da CAT aos agentes de stresse impostos. Da mesma forma, Kim *et al.* (1995) concluíram que a enzima glutathione peroxidase era preferencialmente induzida relativamente à catalase, em células de *Saccharomyces cerevisiae*, na eliminação das ERO geradas pelo paraquato a 0.001 mM.

É necessário referir que o paraquato é um indutor de radicais superóxido, tal como o aumento da pressão parcial de oxigénio, e que poderá induzir as enzimas anti-oxidantes responsáveis pela desintoxicação deste tipo de radical, como é o caso da SOD. A GR será induzida de uma forma indirecta a partir do aumento do radical superóxido, o qual aumenta a concentração de H_2O_2 na célula.

No caso do peróxido de hidrogénio, a CAT e a GR são as enzimas responsáveis pela sua eliminação. Este radical poderá originar um outro radical muito mais prejudicial à célula, que é o radical hidróxilo. Claro que, se estes agentes actuam de formas diferentes, são também diferentes os respectivos mecanismos de indução. Izawa *et al.* (1995) confirmaram a importância da

glutathione reductase na resposta ao stresse imposto pelo H_2O_2 . A sensibilidade a este químico aumentava quando células de *Saccharomyces cerevisiae* eram expostas a agentes inibidores da glutathione como o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno ou a L-butionina sulfoximina, enquanto que a resistência aumentava quando as células eram tratadas com agentes indutores da glutathione, como aminoácidos.

6.3.2.2 Resposta à pressão de ar/oxigénio com e sem pré-tratamento

São muitos os trabalhos nos quais as células de levedura e de bactéria são pré-tratadas com doses sub-letais de agentes de stresse, nomeadamente com H_2O_2 (Izawa *et al.*, 1995; Izawa *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995; Steels *et al.*, 1994), paraquato (Agius *et al.*, 1998; MacMichael, 1988; Kim *et al.*, 1995) de forma a induzir tolerância a doses letais de stresse. De realçar que não existem estudos semelhantes com a estirpe de levedura utilizada neste trabalho.

Os resultados das actividades enzimáticas obtidas para cada enzima estão representados na Tabela 6.5.

Tanto a SOD como a GR foram acentuadamente induzidas quando se utilizou oxigénio puro desde o início da experiência. Foi na experiência com 4.0 bar de O_2 puro que se observaram maiores níveis de actividades das enzimas anti-oxidantes. De facto, após 24 h de exposição ao stresse imposto, a actividade da enzima GR foi induzida cerca de 4.4 vezes para 1.2 bar e 4.9 vezes para 4.0 bar de oxigénio puro, por comparação com os níveis controlo. Também a actividade da SOD, aumentou 4.7 vezes para 1.2 bar e 6.2 vezes para 4.0 bar de oxigénio puro. De acordo com o que se observou na Figura 6.8, para as pressões de 4 bar de oxigénio puro e 10 bar de ar, não se observou crescimento, o que leva a colocar a hipótese das células de levedura estarem no seu limite de defesa anti-oxidante, não conseguindo tolerar estes valores de pressão de ar.

Tabela 6.5 Actividade específica das enzimas anti-oxidantes, superóxido dismutase total (SOD), catalase (CAT) e glutiona reductase (GR), após 24 h de exposição a 1.2 bar e a 4 bar de pressão de O₂ puro; e após 1 h, 8 h e 24 h de exposição a várias pressões de ar e de O₂, com com pré-tratamento com 1.2 bar de pressão de ar. Os níveis controlo foram considerados os que se obtiveram na experiência realizada com 1.2 bar de ar e com 6 bar de ar (o desvio padrão não excedeu 10 %)

Gás	Pressão (bar)	Tempo (h)	Actividade (U·mg ⁻¹)		
			SOD total	CAT	GR
O ₂	1.2	24	174.2	0.026	1.27
	4.0	24	226.2	0.059	1.41
1.2 ar +	2 O ₂	1	85.9	0.038	0.49
		8	82.8	0.048	0.50
		24	55.4	0.008	0.33
	4 O ₂	1	70.0	0.087	0.43
		8	45.6	0.046	0.26
		24	59.5	0.023	0.35
	6 O ₂	1	120.2	0.091	0.55
		8	109.5	0.066	0.48
		24	199.0	0.044	0.91
	10 ar	1	104.0	N.D.	0.66
		8	135.2	0.098	0.86
		24	183.4	0.016	0.89
ar	6.0	24	65.1	0.036	0.67

N.D. – não disponível.

No estudo realizado com *Streptococcus lactis*, Taniguchi *et al.* (1992) verificou que mediante a exposição a oxigénio hiperbárico a 6.0 bar a actividade da SOD duplicava relativamente a condições de anaerobiose. Também Westerbeek-Marres *et al.* (1988) observaram elevados níveis de indução da enzima SOD em células de *Saccharomyces cerevisiae* em condições de hiperóxia.

Ao contrário da SOD e da GR, mais uma vez a actividade da CAT diminuiu, ao fim de 24 h de exposição ao oxigénio puro. Os níveis enzimáticos encontrados

nas experiências realizadas com O₂ puro desde o início do ensaio foram superiores aos encontrados nas experiências realizadas com os oxidantes químicos.

Lee e Hassan (1987) estudaram a influência do aumento da pressão parcial de oxigénio em culturas contínuas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estes autores verificaram, tal como no presente trabalho, que a exposição a 100 % de O₂ induz a enzima SOD e reprime a enzima CAT. No entanto, quando utilizam a pressão de O₂ puro, a actividade da SOD foi 80 a 160 % superior ao caso anterior. Estas variações dos níveis enzimáticos eram acompanhadas por um decréscimo de 25 % a 40 % da concentração celular.

De forma a estudar os mecanismos de adaptação das células de levedura *Kluyveromyces marxianus*, determinaram-se as actividades das enzimas anti-oxidantes nas células de leveduras pré-tratadas com uma pressão de ar de 1.2 bar (Tabela 6.5). Os níveis enzimáticos da SOD e da GR diminuíram em relação às experiências sem pré-tratamento, sendo da ordem de grandeza dos níveis controlo. Estes resultados aliados aos do crescimento, permitem inferir que o pré-tratamento conferiu às células a capacidade de tolerar o stresse imposto sem necessitar de induzir as defesas anti-oxidantes como resposta ao stresse oxidativo. No entanto, com o aumento da pressão de O₂ puro para 6 bar, e da pressão de ar para 10 bar, já se verificou uma elevada indução da actividade da SOD e da GR, 5 vezes e 3 vezes, respectivamente, após 24 h de exposição à pressão.

Mais uma vez se verifica a baixa sensibilidade da CAT ao aumento da pressão total e parcial de oxigénio.

Os resultados sugerem que o pré-tratamento levou a uma indução da capacidade de resposta das células ao aumento da pressão de O₂ puro. Ao contrário, quando se utilizou oxigénio hiperbárico, sem pré-tratamento, as células não se adaptaram a pressões superiores a 4.0 bar de O₂ puro. Estudos anteriores (Pinheiro *et al.*, 1997) demonstraram que o crescimento de células de

Saccharomyces cerevisiae é completamente inibido para pressões de oxigénio puro superiores a 8 bar.

6.3.3 Efeito da pressão na morfologia celular

6.3.3.1 *Análise microscópica*

Embora as células de levedura cresçam, apesar das condições adversas que lhes são impostas, podem estar a sofrer alterações morfológicas a nível de forma e de tamanho. Este tipo de informação, que é bastante útil para uma maior compreensão dos mecanismos de defesa celulares, pode ser obtida a partir de técnicas de microscopia e de análise de imagem.

Nas fermentações industriais, a morfologia das leveduras pode influenciar significativamente as propriedades reológicas do meio de cultura, a taxa de transferência de oxigénio, a taxa de consumo de nutrientes, e estes por sua vez, podem afectar o desenrolar dos mecanismos metabólicos celulares (Walker, 1998). A microscopia electrónica de varrimento (MEV) é uma técnica que se torna útil para o estudo da topologia das células e consequentemente para o maior conhecimento da morfologia celular de forma a ser possível controlar determinadas formas morfológicas para a optimização da produtividade.

Durante o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, é possível observar todas as formas morfológicas descritas na Tabela 6.6. Segundo o trabalho realizado por O'Shea e Walsh (1996), numa primeira fase de crescimento, fase de aceleração do crescimento, a percentagem de células simples diminui, para dar início ao aumento da percentagem de células duplas. Após esta fase, e durante a fase pré-exponencial, a quantidade de filamentos duplos começa a aumentar. Durante a fase exponencial de crescimento predominam os micélios. À medida que a concentração de nutrientes diminui, na fase final do crescimento, nota-se um aumento considerável na percentagem de células simples. O aparecimento de células filamentosas numa cultura pode representar uma

adaptação da levedura à limitação de nutrientes no meio de cultura (Walker, 1998).

Tabela 6.6 Tipos de morfologia que a levedura *Kluyveromyces marxianus* pode apresentar

Morfologia celular	Descrição
Forma de levedura	Células simples com forma esférica ou elipsoidal
Forma alongada de levedura	Células alongadas elipsoidais
Filamentosa	Leveduras que crescem vegetativamente em forma de levedura ou na forma de filamentos, sem constrição visível (hifa ou pseudo-hifa)
Levedura dupla	Levedura a gemular, elipsoidal ou alongada, contendo uma constrição na junção entre a célula mãe e a célula filha.
Filamento duplo ou pseudo-hifa	Filamentos aderidos formados pela célula em crescimento ou pela fragmentação do micélio. A pseudo-hifa é uma forma intermédia entre uma cadeia de células de levedura e uma hifa.
Micélio	Cadeias de leveduras resultantes de gemulação que se alongaram e não se separaram. Pode ser ou não ramificado.

No caso das leveduras com importância industrial, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a levedura *Kluyveromyces marxianus*, a ocorrência de dimorfismo, do qual resultam filamentos longos e finos, com elevada área superficial, é bastante vantajoso em processos de imobilização, em oposição às células elipsoidais, simples, com menor área superficial. (Walker, 1998). O dimorfismo pode ser influenciado por diversos factores como a limitação da fonte de azoto ou pela presença ou ausência de oxigénio (Walker e O'Neill, 1996).

As figuras seguintes (Figura 6.13 A a E) mostram imagens de microscopia de contraste de fase de células de levedura recolhidas após 24 h de exposição a um dos três agentes de stresse estudados no presente capítulo: pressão de ar e pressão de oxigénio puro.

As Figura 6.13 A, B e C mostram claramente as várias morfologias que as células desta estirpe de levedura podem apresentar. Na Figura 6.13 A, observam-se células de leveduras simples e também células duplas. Na Figura 6.13 B pode comprovar-se que a limitação de oxigénio induz a ocorrência de dimorfismo nas células de levedura, pelo elevado conteúdo de micélio encontrado na imagem (assinalado com setas). Ao contrário, o aumento da concentração de oxigénio no meio de cultura, através da pressão de oxigénio puro (1.2 bar) (Figura 6.13 C) tornou as células mais cilíndricas relativamente às da Figura 6.13 A. A mesma forma cilíndrica é observada na Figura 6.13 D com a pressão de oxigénio puro de 4 bar. Note-se que predomina o tipo de célula simples quando é aplicada a pressão de oxigénio puro.

O aumento subsequente da pressão para 6 bar de oxigénio puro tem o efeito contrário, isto é, as células apresentam uma forma mais alongada perdendo a forma cilíndrica. Talvez a elevada percentagem de células não viáveis apresentada neste ensaio (Figura 6.11) seja uma possível explicação. Estas evidências são fortemente apoiadas pelas imagens das Figura 6.14, que acabam por ser uma confirmação das anteriores com um número menor de células, e com pormenores de estrutura membranar que não são evidentes nas figuras obtidas por microscopia de contraste de fase. De facto, com as imagens obtidas por MEV é possível observar os aspectos estruturais das células com maior detalhe.

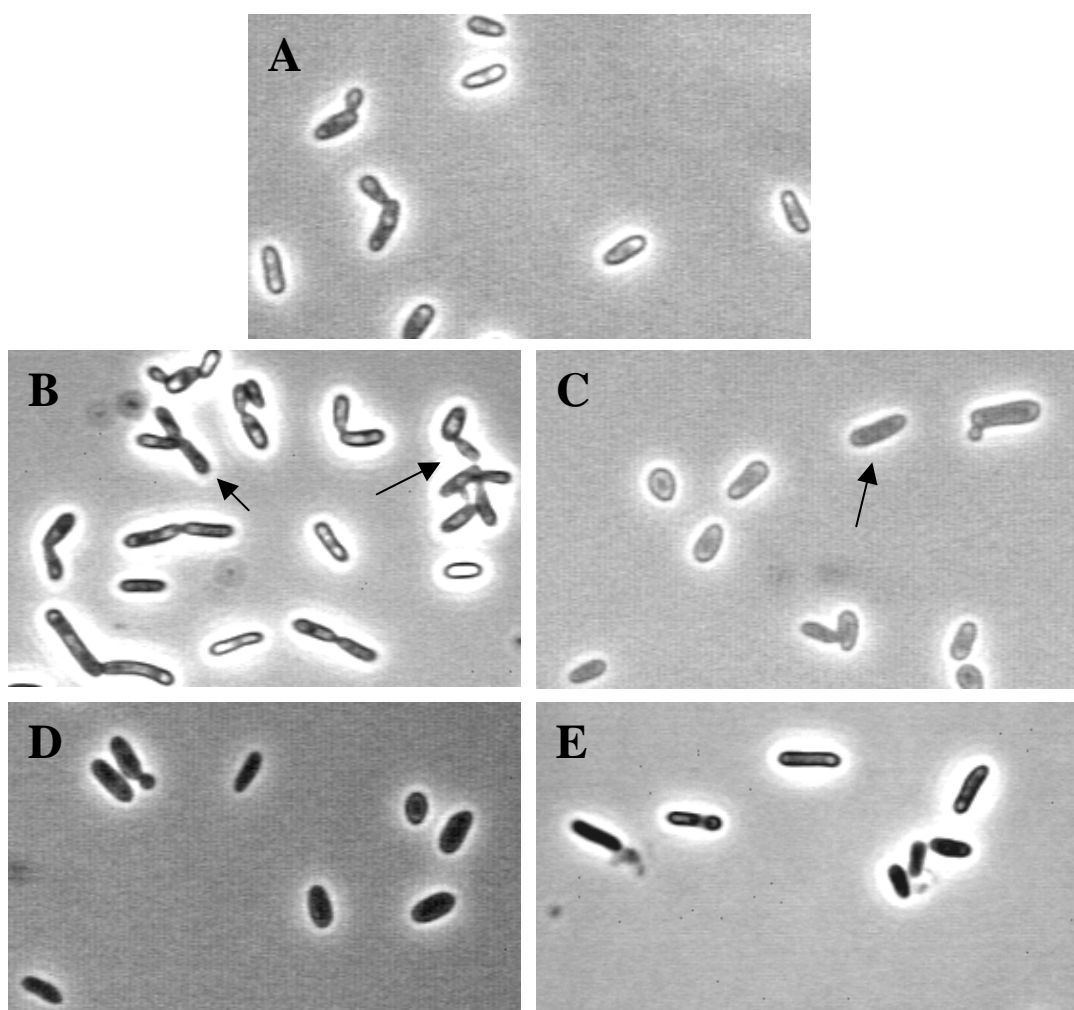


Figura 6.13 Microscopia de contraste de fase. Alterações morfológicas na levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 após tratamento com pressão. Amostras correspondentes ao tempo 24 h (Ampliação microscópica 630x). (A) 1.2 bar de ar; (B) Micro-arejamento em matraz; (C) 1.2 bar de oxigénio puro; (D) 1.2 bar de ar + 4 bar de oxigénio puro; (E) 1.2 bar de ar + 6 bar de oxigénio puro.

As imagens da Figura 6.14 apresentam diferenças significativas entre elas. As imagens da Figura 6.14 B recolhidas durante o ensaio com micro-arejamento apresentam uma forma celular bastante alongada, em oposição às células crescidas com 1.2 bar de ar (Figura 6.14 A) as quais apresentam uma forma elipsoidal.

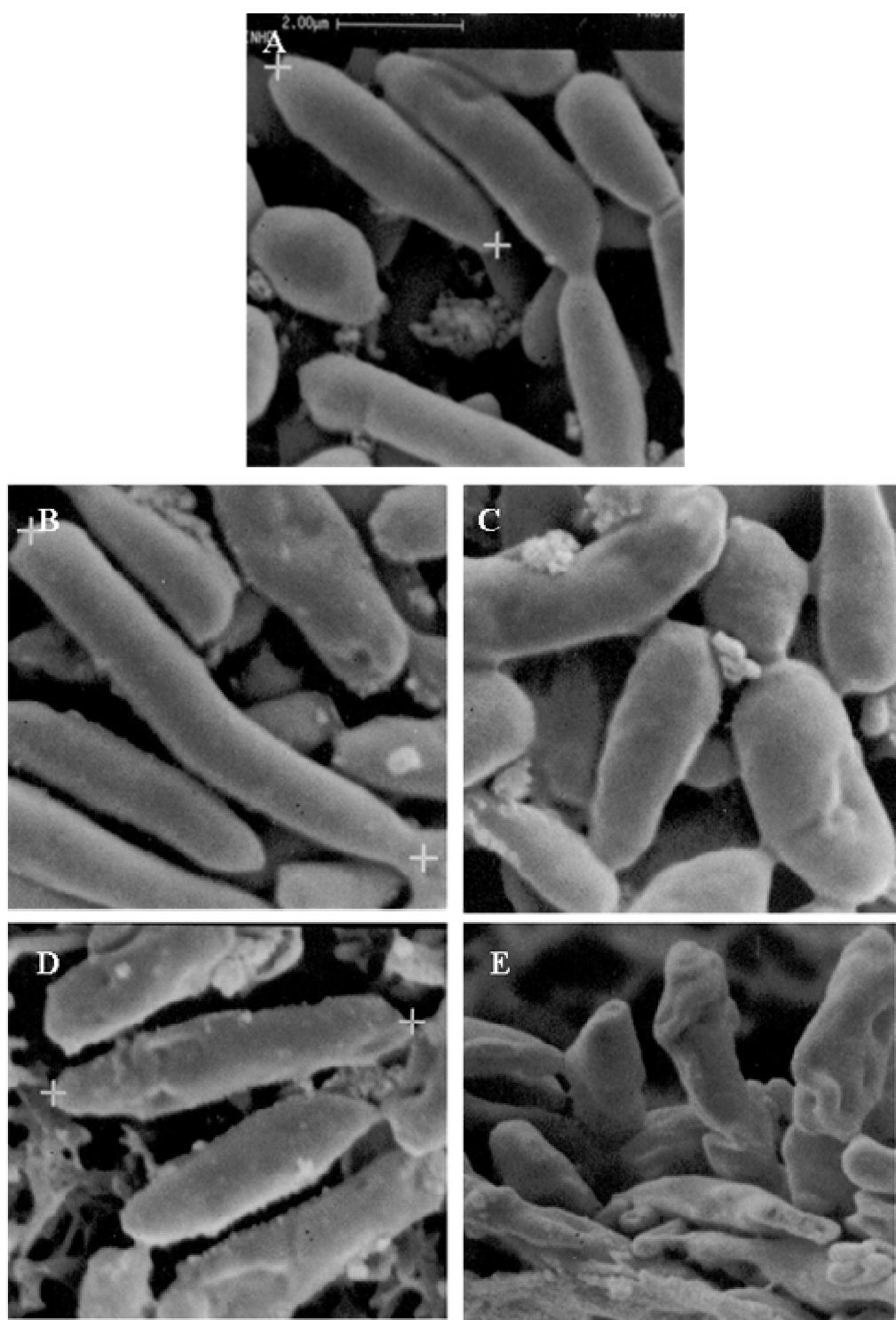


Figura 6.14 Microscopia electrónica de varrimento. Alterações morfológicas na levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 após tratamento com pressão. Amostras correspondentes ao tempo 24 h. Ampliação de 10000x. (A) 1.2 bar de ar; (B) Micro-arejamento em matraz; (C) 1.2 bar de oxigénio puro; (D) 1.2 bar de ar + 4 bar de oxigénio puro; (E) 1.2 bar de ar + 6 bar de oxigénio puro.

Da Figura 6.14 A para a Figura 6.14 C e D o aspecto cilíndrico mantém-se, embora a área aumente, em termos de largura da célula, dando a ideia que o volume celular aumentou com a pressão de oxigénio puro. Note-se que não foi o valor da pressão *per se*, mas o tipo de gás aplicado. À medida que o valor da pressão de oxigénio puro aumenta os danos da parede celular também aumentam. As células deixam de apresentar o aspecto “liso” da Figura 6.14 A, para passarem a ter um aspecto rugoso e irregular, com algumas zonas de cavidades. Este tipo de danos celulares foi também observado por Gola *et al.* (1996) em esporos de *Bacillus cereus* após 3 min de exposição a uma pressão hidrostática de 3 kbar. Neste estudo foi aplicado um valor de pressão com uma ordem de grandeza bem diferente do presente trabalho, no entanto, os danos da superfície da membrana foram bastante semelhantes.

Por exemplo, no trabalho de Amrane e Prigent (1998) as células de levedura *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* CBS 397 apresentam morfologias completamente diferentes apenas por crescerem com controlo de pH, 4.5, ou sem controlo de pH (pH final de 2.3), desta forma, as últimas células apresentam uma forma cilíndrica e filamentosa, enquanto que as primeiras apresentam-se elipsoidais e sem filamentos. No entanto, após exposição durante 23 h, a um agente de autólise, temperatura de 50 °C, as células que tinham crescido com controlo de pH ficaram completamente danificadas, apresentaram a forma de balões murchos, enquanto que as que cresceram sem controlo de pH, ficaram praticamente inalteradas, apresentando apenas uma solubilização parcial do peso seco inicial. Estes resultados sugeriram a estes autores a existência de dupla camada na parede celular da estirpe estudada, tal como na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Quando a pressão de oxigénio puro atinge o valor máximo estudado, 6 bar, as células deixam de ter a forma cilíndrica para passarem a apresentar uma forma bastante semelhante à observada no trabalho referido anteriormente.

Os resultados levam a concluir que as células se adaptam morfológicamente às condições adversas que lhes são impostas. No entanto, existe um limite, a partir do qual as células não conseguem tolerar a adversidade, desencadeando um processo de alteração morfológica, que provavelmente, antecede a lise celular. Esta condição limite, no presente trabalho é para pressão de oxigénio puro superior ou igual a 4 bar. Deve-se, no entanto referir que os resultados observados são para um tempo de exposição (24 h) superior ao utilizado noutros trabalhos.

6.3.3.2 *Análise de Imagem*

Recorrendo-se às técnicas de análise de imagem, foi possível recolher informação adicional acerca da morfologia celular e ainda obter mais alguns dados sobre o estado fisiológico da cultura, nomeadamente a formação de micélio.

Na Figura 6.15 A é possível constatar as diferenças encontradas entre o tamanho, em área projectada, das células de levedura *Kluyveromyces marxianus* após exposição a diferentes pressões de ar e/ou de oxigénio.

Nos ensaios com pressão de ar de 6 bar e com micro-arejamento predominam as células com tamanhos de 10 μm^2 e 20 μm^2 (Figura 6.15 A). Nos restantes ensaios, com 1.2 bar de ar e de oxigénio puro, a maior percentagem das células apresenta dimensões inferiores a 10 μm^2 . No final dos ensaios, 40 h (Figura 6.15 B), o comportamento das curvas é praticamente coincidente para todos os ensaios, o que significa que a área média das células também tem valores próximos, entre 10 μm^2 e 20 μm^2 . Segundo O'Shea e Walsh (1996), estes valores aplicam-se a células simples de levedura *Kluyveromyces marxianus*, enquanto que o micélio apresenta uma área bastante superior, 60 μm^2 .

Os resultados descritos anteriormente não impedem que as células tenham formas diferentes, e precisamente devido à grande variabilidade de formas

morfológicas que esta estirpe pode apresentar (Tabela 6.6), torna-se necessário determinar outros parâmetros adicionais que confirmem se os valores de área correspondem a uma forma cilíndrica, ou a uma forma de filamentos longos e ramificados.

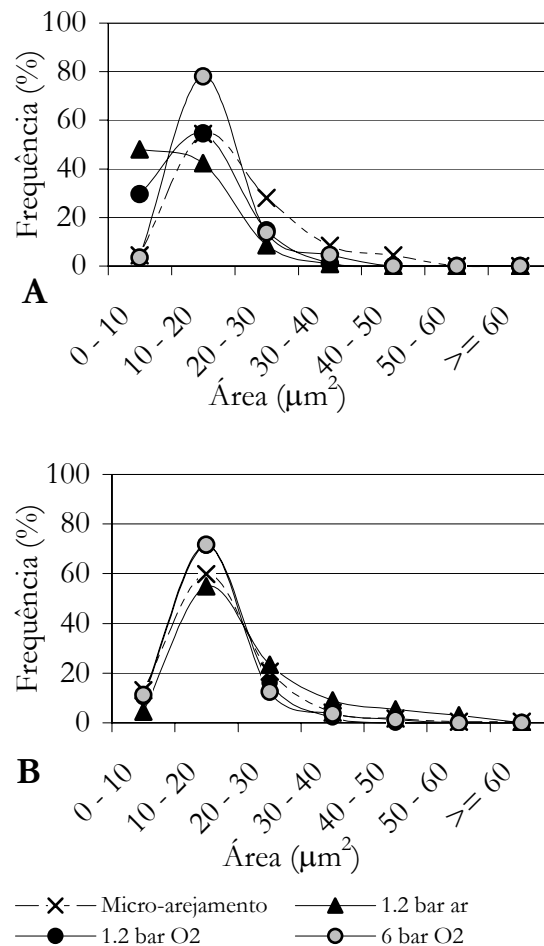


Figura 6.15 Distribuição de tamanhos, área, das células de levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, ao longo do tempo dos ensaios, com micro-arejamento, 1.2 bar de ar, 1.2 bar de oxigênio puro e 6 bar de oxigênio puro, para as amostras recolhidas após 15 h (A) e 40 h (B).

Tal como mencionado no sub-capítulo 3.5.1, o parâmetro $F_{máx}/F_{min}$ foi designado de alongamento no caso da levedura *Kluyveromyces marxianus* devido à sua forma alongada. Através da análise da Figura 6.16, é possível observar a grande variedade de valores obtidos para este parâmetro, não sendo possível

aproximar as curvas a um comportamento Gaussiano. Durante a fase exponencial de crescimento, (Figura 6.16 A), existem em cultura células simples, $1.0 < F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}} < 2.5$, células alongadas, $2.5 \leq F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}} < 3.5$, e filamentosos, $F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}} \geq 3.5$. Estes valores são propostos por O'Shea e Walsh (1996), para células de *Kluyveromyces marxianus* com área compreendida entre $8 \mu\text{m}^2$ e $25 \mu\text{m}^2$.

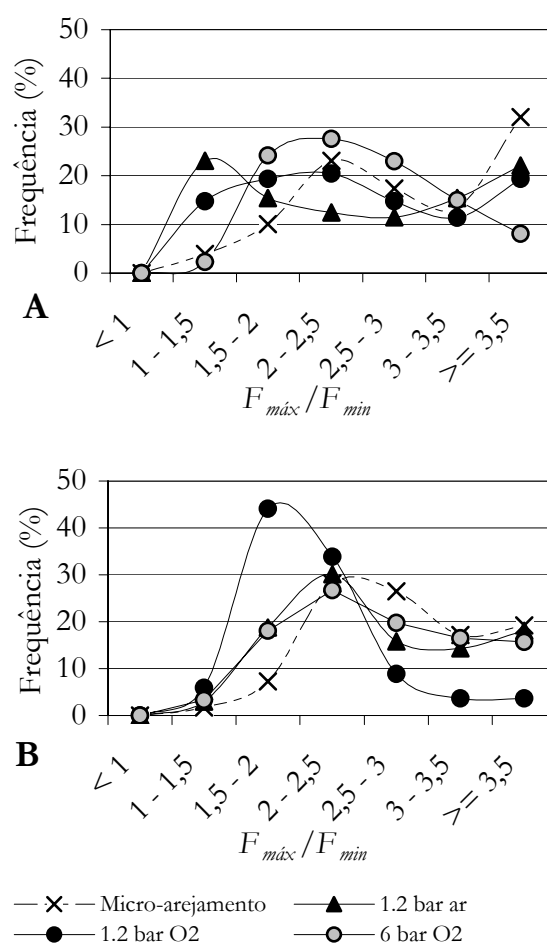


Figura 6.16 Distribuição da frequência de circularidade, $F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$, das células de levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, ao longo do tempo dos ensaios, com micro-aeração, 1.2 bar de ar, 1.2 bar de oxigénio puro e 6 bar de oxigénio puro, para as amostras recolhidas após 15 h (A) e 40 h (B).

É possível observar que o ensaio com micro-aeração possui a maior percentagem de células com $F_{\text{máx}}/F_{\text{mín}}$ superior a 3.5. Este resultado está em conformidade com a Figura 6.13 B, na qual é elevado o número de células

filamentosas. Este tipo de comportamento parece indicar que o alongamento das células surge como adaptação à limitação de oxigénio, pois quanto maior é o alongamento, maior é a área específica para a transferência de massa deste nutriente.

Para as pressões mais baixas, 1.2 bar de ar e de oxigénio, o parâmetro $F_{máx}/F_{min}$ apresenta valores inferiores a 1.5, indicando a presença de células mais esféricas, *i.e.*, menos alongadas do que as referidas anteriormente.

No final dos ensaios, e decorridas 40 h, (Figura 6.16 B) verifica-se uma uniformização dos tamanhos das células uma vez que as curvas tornam-se mais estreitas. No ensaio com 1.2 bar de ar a maior percentagem de células possui $1.5 < F_{máx}/F_{min} < 2.0$, predominado células de levedura simples com forma cilíndrica. Resultados coerentes com as observações da Figura 6.13 A.

Com os resultados obtidos concluiu-se que devido às dimensões encontradas a forma de célula de levedura alongada e cilíndrica foi a forma morfológica celular que predominou nos ensaios realizados com as pressões mais baixas. Nos ensaios com micro-arejamento e com 6 bar de oxigénio puro as células tinham uma forma mais alongada e eram mais pequenas e no primeiro caso, eram filamentosas. Os resultados obtidos por MEV confirmaram as conclusões anteriormente referidas.

Estes métodos de análise, se aliados à microscopia e ao consequente processamento da imagem, permitem a recolha de informação acerca da morfologia celular que não pode ser providenciada por qualquer outra técnica.

6.4 Conclusões

Neste capítulo foi estudada a resposta da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 ao stresse oxidativo causado por agentes químicos e físicos, paraquato e peróxido de hidrogénio, e pressão de ar e de oxigénio.

Após 1 h de exposição aos agentes de stresse químico, paraquato e peróxido de hidrogénio, as células apresentaram valores elevados de actividades das enzimas anti-oxidantes, SOD e GR. O facto das células de levedura terem crescido durante a fase exponencial em condições de pressurização, conferiu às células a capacidade de tolerarem 50 mM de peróxido de hidrogénio e 1 mM de paraquato. No entanto, notou-se que a pressão total de ar de 6 bar aliada ao oxidante paraquato induziu preferencialmente a SOD relativamente às outras condições, o que poderá levar a concluir que são estes dois factores têm um efeito sinérgico provocando uma situação mais adversa à célula de levedura.

Foi demonstrado que as células de levedura não toleram os gases hiperbáricos para valores superiores ou iguais a 4.0 bar de oxigénio puro e a 10 bar de ar, quando existe este stresse é imposto abruptamente sem fase de adaptação gradual. Ao contrário, quando as células foram submetidas a um pré-tratamento com uma pressão de ar de 1.2 bar, foram capazes de crescer e tolerar o stresse imposto, tolerando pressões de oxigénio puro até 4 bar e de ar até 10 bar, através da indução de enzimas anti-oxidantes, como a SOD e a GR.

As enzimas SOD e GR foram bastante induzidas em resposta a diferentes agentes de stresse químico e hiperbárico. No entanto, notou-se uma maior indução quando se utilizou o ar ou o oxigénio hiperbárico como agente de stresse. A enzima CAT parece não ser uma enzima de defesa importante para esta estirpe no caso do peróxido de hidrogénio e do paraquato.

Foi ainda possível observar alterações morfológicas bastante acentuadas após 24 h de exposição ao oxigénio hiperbárico. De facto, as células de levedura desenvolvem mecanismos de alteração morfológica quando sujeitas a valores de pressão de oxigénio puro de 4 bar. Estes resultados vêm mais uma vez confirmar a situação de stresse oxidativo sofrido pelas células de levedura, uma vez verificada a baixa percentagem de viabilidade assim como os elevados níveis de enzimas anti-oxidantes observados.

De salientar novamente que não é o valor de pressão *per se* o principal agente de stresse, mas sim o oxigénio, gerador de ERO.

A análise de imagem realizada às células expostas a pressões de ar e de oxigénio permitiu concluir que pressões baixas (1.2 bar) favorecem uma morfologia celular alongada e cilíndrica, pressões mais elevadas de oxigénio (6 bar), favorecem a morfologia celular mais alongada e o micro-arejamento favorece o aparecimento de células filamentosas bastante alongadas e de pequenas dimensões.

Com este conjunto de análises foi possível esclarecer o comportamento da levedura em condições de stresse oxidativo, causadas pelo aumento da pressão e pela exposição ao paraquato e peróxido de hidrogénio.

Capítulo 7

Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro

Sumário

Neste capítulo são referidas as principais conclusões deste trabalho, sendo ainda sugeridas algumas perspectivas de trabalho a realizar futuramente.

7.1 Conclusões	236
7.2 Perspectivas de Trabalho Futuro	240

7.1 Conclusões

O trabalho realizado na presente dissertação pretendeu dar continuidade ao trabalho que tem sido desenvolvido no âmbito de um projecto sobre os mecanismos de adaptação de microrganismos em condições extremas e aplicação de biorreactores hiperbáricos em biotecnologia. Pretendeu-se aplicar a pressão como meio de melhorar a taxa de transferência de oxigénio no meio de cultura, envolvendo leveduras com interesse industrial. Utilizando como principal fonte de carbono os açúcares que se encontram em maior quantidade em alguns meios de cultura industriais, em alternativa à glucose. Simultaneamente contribuiu-se para o estudo da resposta de defesa anti-oxidante de estirpes de levedura ao aumento do stresse oxidativo pela pressão de gases.

Foi demonstrado que as duas estirpes de levedura estudadas, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022 (*Kluyver* negativa) e *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894 (*Kluyver* negativa), não são inibidas para pressões totais de ar até 6 bar de ar. É possível favorecer a assimilação do etanol produzido pelas células da levedura *Kluyver* negativa (*Kluyveromyces marxianus* ATCC 10022) através do aumento da pressão. Concluiu-se que quando se passa de uma condição de limitação de oxigénio para uma de pleno arejamento (pressão) o metabolismo da levedura passa de oxidoreduutivo para, predominantemente, oxidativo.

Relativamente à levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 7894, verificou-se que o aumento da pressão total de ar até 6 bar aumenta consideravelmente a produtividade em biomassa, assim como a taxa específica de crescimento.

A realização de ensaios com misturas enriquecidas com dióxido de carbono permitiu dissociar os efeitos do aumento da pressão parcial de dióxido de carbono dos efeitos da pressão total de ar. Com os valores de pressão parcial de dióxido de carbono testados, máximo de 280 mbar, foi possível constatar uma

ligeira inibição do crescimento, pois a taxa específica de crescimento foi mais baixa.

Com os resultados obtidos concluiu-se que é possível, através do aumento da taxa de transferência de oxigénio com a utilização do aumento da pressão de total de ar, conseguir a optimização dos processos de produção da enzima β -galactosidase, especialmente em culturas de elevada densidade celular, onde a oxigenação do meio é muitas vezes insuficiente.

Neste trabalho foi possível constatar que para valores de pressão total de ar até 6 bar as estirpes de leveduras revelaram ser bastantes resistentes uma vez que não se observou inibição do crescimento.

O trabalho realizado com a estirpe *Candida utilis* CBS 7894 permitiu, mais uma vez, exemplificar a aplicabilidade do ar hiperbárico em culturas de elevada densidade celular. Numa primeira fase concluiu-se que o oxigénio, quando presente em excesso, pode tornar-se inibidor do crescimento. No entanto, em culturas de elevada densidade celular de *Candida utilis* CBS 621, nas quais o oxigénio é um factor limitante, observou-se crescimento com uma pressão de ar de 6 bar, isto é, a taxa de transferência de oxigénio era próxima da taxa de consumo de oxigénio, ao contrário do que aconteceu com as experiências em que a biomassa era relativamente baixa.

Em operação semi-contínua, concluiu-se que, a pressurização de culturas com uma concentração celular de 40 g L^{-1} com um valor de 6 bar, não disponibiliza às células oxigénio suficiente para a sua actividade respiratória. Em contrapartida, quando se utiliza uma pressão de ar de 12 bar é possível ultrapassar esta limitação, e como consequência a concentração celular não diminui, assim como não há produção de etanol.

O trabalho permitiu verificar que as células de levedura *Kluyveromyces marxianus* foram capazes de induzir enzimas anti-oxidantes, como a SOD e a GR, logo após 1 h de exposição ao paraquato e ao peróxido de hidrogénio. Concluiu-se ainda

que as células conseguem tolerar os oxidantes químicos, nas concentrações estudadas, parecendo existir uma protecção cruzada entre os dois tipos de agentes de stresse, pressão de ar e oxidantes químicos.

Os resultados sugerem a existência de um limite na capacidade da célula em induzir alguns sistemas de defesa anti-oxidante, quando esta é submetida a alterações bruscas de pressão, para valores superiores ou iguais a 4.0 bar de oxigénio puro e a 10 bar de ar. Contudo, quando as células são submetidas a um pré-tratamento, com 1.2 bar de pressão de ar, são capazes de crescer e tolerar o stresse imposto, tolerando pressões de oxigénio puro até 4 bar e até 10 bar de ar, através da indução de enzimas, como a SOD e a GR. As enzimas SOD e GR foram bastante induzidas em resposta a diferentes agentes de stresse químico e hiperbárico. No entanto, notou-se uma maior indução quando se utilizou o ar ou o oxigénio hiperbárico como agente de stresse. A enzima CAT parece não ser uma enzima de defesa importante para esta estirpe quando exposta a peróxido de hidrogénio e a paraquato.

A análise à morfologia da célula de levedura *Kluyveromyces marxianus* permitiu confirmar o efeito negativo do aumento da pressão de ar até 6 bar de oxigénio puro, sendo possível constatar a existência de alterações morfológicas.

Na Tabela 7.1 estão resumidos os resultados obtidos neste trabalho que relacionam o efeito da pressão, para os valores estudados, com o comportamento metabólico das leveduras em relação ao seu crescimento e formação de produtos.

Tabela 7.1 Efeito da pressão total de ar (P), da pressão parcial de oxigénio (p_{O_2}) e pressão parcial de dióxido de carbono (p_{CO_2}) no comportamento metabólico das estirpes de leveduras estudadas na presente dissertação

Levedura	P (bar)	p_{O_2} (bar)	p_{CO_2} (bar)	Efeito		Modo de operação
				Crescimento	Produtos	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 10022	6	1.26	0.0018	Aumento da produção em biomassa, dependendo da concentração em lactose	Aumento do metabolismo oxidativo do etanol	Descontínuo
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894	6	1.26	0.0018	Aumento de $Y_{X/S}$ (40 g · L ⁻¹ de lactose)	Aumento da actividade específica de β -galactosidase	Descontínuo
	6	1.26	0.28	Ligeira diminuição de μ	-	Descontínuo
<i>Candida utilis</i> CBS 621	6	1.26	0.0018	Aumento da produção em biomassa	Diminuição da produção em etanol	Descontínuo
	12	2.52	0.0036	Aumento da produção em biomassa	Diminuição da produção em etanol	Semi-contínuo

7.2 Perspectivas de Trabalho Futuro

O trabalho realizado suscitou várias questões que poderão ser estudadas em trabalho futuro, referindo-se as seguintes sugestões:

- Tendo em conta que todas as estirpes estudadas conseguem tolerar valores de pressão de ar moderadas de 6 bar, seria interessante utilizar culturas de elevada densidade celular, que justifiquem estes valores de pressão, possibilitando a formação de elevadas produtividades em biomassa, evitando a necessidade de aumentar a velocidade de agitação e o caudal de arejamento.
- Testar outro tipo de substratos com a levedura *Candida utilis*, nomeadamente celulosas.
- Alargar o leque de espécies de leveduras não-*Saccharomyces* com interesse industrial, como por exemplo:
 - A levedura *Hansenula polymorpha*, devido à sua capacidade de crescer em metanol como substrato para a produção de proteína microbiana;
 - A levedura *Candida maltosa*, pois trata-se de um microorganismo bastante atractivo para a biotransformação de ácido gordos a partir do seu crescimento em alcanos.
 - Entre as várias leveduras, utilizar estirpes de leveduras recombinadas, e estudar o efeito da pressão na expressão do produto recombinante.
- O estudo da aplicação da pressão a uma estirpe super-produtora de β -galactosidase, terá certamente muito interesse pois poderá permitir a optimização da produtividade do processo industrial desta enzima.

- Em relação aos biorreactores utilizados, uma forma de colmatar algumas das limitações verificadas neste trabalho, seria introduzir uma sonda de oxigénio. Implementando métodos mais expeditos de determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio no biorreactor hiperbárico.
- A alteração do procedimento experimental na execução dos ensaios será outra sugestão a fazer. Nomeadamente seria de explorar a realização de ensaios mais curtos com a recolha das células, submetendo-as novamente a outras condições de pressão.
- Um dos aspectos focados neste trabalho foi o modo de operação, sendo bastante interessante a realização de outros ensaios em semi-contínuo com diferentes estratégias de alimentação. O estudo do modo de operação em contínuo permitiria completar o estudo do comportamento metabólico da levedura *Candida utilis* assim como de outras leveduras.
- Na área da estratégia operacional, deveria de ser considerada a introdução da pressão como variável de optimização e de controlo de processos de cultura de células.
- Seria igualmente de estudar, usando técnicas de biologia molecular, a expressão ou repressão genéticas das enzimas e proteínas de stresse ocasionadas pelo aumento da pressão.

Capítulo 8

Bibliografia

- Abel, C., Linz, F., Scheper, T., Schugerl, K. (1994) Transient behaviour of continuously cultivated Baker's yeast during enforced variations of dissolved oxygen and glucose concentrations. *J. Biotechnol.*, 33, 183-193.
- Agius, D.R., Bannister, W.H., Balzan, R. (1998) Prokariotic iron superoxide dismutase replaces cytosolic copper, zinc superoxide dismutase in protecting yeast cells against oxidative stress. *Biochem. Mol. Biol. Intern.*, 44(1), 41-49.
- Amaral, A.L., Bapiste, C., Pons, M.N., Nicolau, A., Lima, N., Ferreira, E.C., Mota, M., Vivier, H. (1999) Semiautomated recognition of protozoa by image-analysis. *Biotechnol. Techniq.*, 13(2), 111-118.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. (1993) Oxidants are a major contributor to cancer and aging. In: *DNA and Free Radicals*. Halliwell, B., Aruoma, O.I., (eds.), Ellis Horwood, London.
- Amrane, A., Prigent, Y. (1998) Effect of culture conditions of *Kluyveromyces marxianus* on its autolysis, and process optimization. *Bioproc. Eng.*, 18, 383-388.
- Athès, V., Combes, D. (1998) Influence of additives on high pressure stability of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* and invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. Microbial. Technol.*, 22, 532-537.
- Athès, V., Lange, R., Combes, D. (1998) Influence of polyols on the structural properties of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase under high hydrostatic pressure. *Eur. J. Biochem.*, 255, 206-212.
- Auberson, L.C.M., von Stockar, U. (1992) A unified stoichiometric model for oxidative and oxidoreductive growth of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 1243-1255.
- Azeredo, J., Meinders, J., Feijó, J., Oliveira, R. (1997) Determination of cell number and size of a population of *Pseudomonas fluorescens* by image analysis. *Biotechnol. Techniq.*, 11(5), 355-358.
- Bailey, J.E., Ollis, D. (1986) *Biochemical Engineering Fundamentals*. MacGraw-Hill, New York, USA.
- Baldwin, S.A., Cheng, T.C., Demopoulos, G.P. (2000) A contribution to the measurement of oxygen mass transfer in a laboratory pressure reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 75, 665-672.
- Barberis, S., Gentina, J.C. (1998) Effect of dissolved oxygen level on lactase production by *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 73, 71-73.
- Barford, J.P. (1990) A general model for aerobic yeast growth: batch growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 53, 907-920.

- Barford, J.P., Hall, R.J.** (1979) An examination of the Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory adaptation. *J. Gen. Microbiol.*, 114, 267-275.
- Barnett, J.A.** (1997) Introduction: A Historical Survey of the study of yeasts. In: *Yeast Sugar Metabolism*. Zimmermann, F.K., Entian, K.D. (eds), Technomic, USA, 1-30.
- Barnett, J.A., Sims, A.P.** (1982) The requirement of oxygen for the active transport of sugars into yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 2303-2312.
- Becker, K., Schirmer, R.H.** (1995) 1795-1995: Milestones in ROS research. *Redox Report*, 1, 309-311.
- Becker, K., Müllert, S., Keese, M.A., Walter, R.D., Schirmer, R.H.** (1996) A glutathione reductase-like flavoenzyme of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: structural considerations based on the DNA sequence. *Biochem. Soc. Trans.*, 24, 67-72.
- Beers, R.F., Sizer, I.W.** (1952) A spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biolog. Chem.*, 195, 276-287.
- Belem, M.A.F., Lee, B.H.** (1998a) Production of Bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 38(7), 565-598.
- Belem, M.A.F., Lee, B.H.** (1998b) Oligosaccharides extracted from cell walls *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. *Biotechnol. Lett.*, 12(3), 229-223.
- Belo, I.** (1999) Estudo do efeito da pressão no comportamento fisiológico de microrganismos. *Tese de doutoramento*, Universidade do Minho, Braga.
- Belo, I., Mota, M.** (1998) Batch and fed-batch cultures of *E. coli* TB1 at different oxygen transfer rates. *Bioproc. Eng.*, 18, 451-455.
- Belo, I., Pinheiro, R., Mota, M.** (2000) Response of the thermophile *Thermus* sp. RQ-1 to hyperbaric air in batch and fed-batch cultivation. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 517-524.
- Belo, I., Pinheiro, R., Mota, M.** (2003) Fed-batch of *Saccharomyces cerevisiae* in a hyperbaric biorreactor. *Biotechnol. Prog.*, 19, 665-671.
- Blanch, H., Moo-Young, M.** (1987) In: *Basic Biotechnology*. Bu'Lock, J., Kristiansen, B. (eds.), Academic Press, London.
- Bothast, R.J., Kurtzman, C.P., Saltarelli, M.D., Slininger, P.J.** (1986) Ethanol production by 107 yeasts on 5, 10 and 20 % lactose. *Biotechnol. Lett.*, 8(8), 593-596.
- Boze, H., Moulin, G., Galzy, P.** (1992) Production of Food and Fodder Yeasts. *Critical Rev. Biotechnol.*, 12(1/2), 65-86.
- Bozzola, J.J., Russell, L.D.** (1992) *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett Publishers, London.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-255.
- van den Broek, P.J.A., van Gompel, A.E., Luttik, M.A.H., Pronk, J.T., van Leeuwen, C.C.M.** (1997) Mechanism of glucose and maltose transport in plasma-membrane vesicles from the yeast *Candida utilis*. *Biochem. J.*, 321, 487-495.
- Castillo, F.J.** (1990) Lactose Metabolism by Yeasts. In: *Yeast: Biotechnology and Biocatalysis*. Verachtert, H., De Mot, R. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 297-320.

- Castrillo, J.I., Kaliterna, J., Weusthuis, R.A., van Dijken, J.P. and Pronk, J.T.** (1996) High-cell-density cultivations of yeasts on disaccharides in oxygen limited batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 621-628.
- Cavaillé, D., Combes, D.** (1995) Carcterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. App. Biochem.*, 22, 55-64.
- Cavaillé, D., Combes, D.** (1998) Irreversible high pressure inactivation of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparison with thermal inactivation. *J. Biotechnol.*, 61, 85-93.
- Cho, M.H., Wang, S.S.** (1988) Enhancement of oxygen transfer in hydridoma cell culture by using a perfluorcarbon as an oxygen carrier. *Biotechnol. Lett.*, 10, 855-860.
- Choi, E.S., Rhee, S.K.** (1999) Metabolic Engineering of Yeasts for Subtrate Utilization and Metabolite Production. In: *Metabolic Engineering*. Lee, S.L., Papoutsakis, E.T. (eds), Marcel Dekker, Inc., New York, 281-307.
- Clark, D.S., Lentz, C.P.** (1961) Submerged citric acid fermentation of sugar beet molasses: effect of pressure and recirculation of oxygen. *Can. J. Microbiol.*, 7, 447-453.
- Clarkson, S., Large, P., Boulton, C., Bamforth, C.** (1991) Synthesis of superoxide dismutase, catalase and other enzymes and oxygen and superoxide toxicity during changes in oxygen concentration in cultures of brewing yeast. *Yeast*, 7, 91-103.
- Cliffe, K.** (1988) Bioreactors. In: *Biotechnology for engineers: Biological systems in technological process*. Scragg, A. (ed.), Ellis Horwood Ltd, England, 277-301.
- Coelho, M.A.Z., Amaral, A.L., Belo, I., Mota, M., Coutinho, J.A.P., Ferreira, E.** (2002) Classification of *Saccharomyces cerevisiae* morphology using image analysis. 4th European Symposium Biochemical Engineering Science, Delft, The Netherlands.
- Cooper, C.M., Fernstrom, G.A., Miller, S.A.** (1944) Performance of agitated gas-liquid contacters. *Ind. Eng. Chem.*, 36, 504-509.
- Correia, M.J., Serzedello, A.** (1995) Produção de proteína monocelular e RNA a partir de *Candida utilis* cultivada em melão. *Ecl. Quím.*, 20, 9-16.
- Costa, V., Moradas-Ferreira, P.** (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.*, 22, 217-246.
- Costa, V., Moradas-Ferreira, P.** (2003) Mecanismos de adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* a condições de stress. In: *Biotecnologia*. Lima, N., Mota, M. (eds.), Lidel, Portugal, 67-80.
- Cox, P.W., Thomas, C.R.** (1992) Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 945-952.
- Dickson, R.C., Martin, J.S.** (1980) Physiological studies of β -galactosidase induction in *K. lactis*. *J. Bacteriol.*, 142, 777-785.
- van Dijken, J.P., Scheffers, W.A** (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Ver.*, 32, 199-224.
- van Dijken, J.P., Weusthuis, R.A., Pronk, J.T.** (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63, 343-352.
- Domingues, L.** (2001) Estirpes floculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para a utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológica. *Tese de doutoramento*, Universidade do Minho, Braga.

- Doran, P.M.** (1995) Mass transfer. In: *Bioprocess Engineering Principles*, Doran, P.M. (ed.), Academic Press, London, 190-217.
- Farr, S., Kogoma, T.** (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.*, 55, 4, 561-585.
- Ferreira, E.C., Mota, M., Pons, M.N.** (2001) New methodologies for multiphase bioreactors 2: image analysis and multiphase bioreactors. In: *Multiphase Bioreactor Design*. Cabral, J.M.S., Mota, M., Tramper, J. (eds.), Taylor & Francis, London, 25-52.
- Ferreira, E.C., Teixeira, J.C.** (2003) Biorreatores. In: *Biotecnologia*. Lima, N., Mota, M. (eds.), Lidel, Portugal, 175-196.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G.F., Kappeli, O.** (1981) Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microbiol. Phys.*, 22, 123-183.
- Fiechter, A., Seghezzi, W.** (1992) Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *J. Biotechnol.*, 27, 27-45.
- Fraisse, L.** (1993) Etude du rôle des mitochondries dans la production d'espèces oxygénées réactives en situation de stress oxydatif. *Tese de doutoramento*, INSA, Toulouse, France.
- Fridovich, I.** (1989) Superoxide dismutases. *J. Biol. Chem.*, 264, 7761-7764.
- Furukawa, K., Heinzle, E., Dunn, I.** (1983) Influence of oxygen on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2293-2317.
- Galiazzo, F., Labbe-Bois, R.** (1993) Regulation of CuZn and Mn-superoxide dismutase transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*, 315(2), 197-200.
- García-Garibay, M., Torres, J., López-Munguía-Canales, A., Casas, L.T.** (1987) Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.*, 9(6), 417-420.
- Gikas, P., Livingstone, A.G.** (1993) Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell biorreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 242, 1337-1351.
- Ghoul, M., Boudrant, J., Engasser, J.M.** (1991) A comparison of different techniques for the control of the growth of *Candida utilis* CBS 621. *Process Biochem.*, 26, 135-142.
- Gifford, G.D., Pritchard, G.G.** (1969) Toxicity of hyperbaric oxygen to yeasts displaying periodic enzyme synthesis. *J. Gen. Microbiol.*, 56, 143-149.
- Gill, C.O., Tan, K.H.** (1979) Effect of carbon dioxide on growth of *Pseudomonas fluorescens*. *App. Environ. Microbiol.*, 38, 237-238.
- Gille, G., Sigler, K.** (1995) Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol.*, 40, 2, 131-152.
- Gola, S., Fornan, C., Carpi, G., Maggi, A., Caasarà, A., Rovere, P.** (1996) Inactivation of bacterial spores in phosphate buffer and in vegetable cream treated with high pressures. In: *High Pressure Bioscience and Biotechnology: Progress in Biotechnology*. Hayashi, R., Balny, C. (eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands.
- González Siso, M.I., Ramil, E., Cerdán, M.E. and Freire-Picos, M.A.** (1996) Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: ethanol production and the Crabtree effect. *Eng. Microbiol. Technol.*, 18, 585-591.
- Grba, S., Stehlik-Tomas, V., Stanzer, D., Vahčić, N., Škrilin, A.** (2002) Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 16(1), 13-16.

- Gregory, E.M., Goscini, S.A., Fridovich, I.** (1974) Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eucariote. *J. Bacteriol.*, 117, 456-460.
- Hack, C.J., Marchant, R.** (1995) The effect of oxygen transfer rate on continuous ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*. *P.-Technol. Biotechnol. Rev.*, 33(4), 151-154.
- Hartmeier, W., Broon, W.K., Dellweg, H.** (1971). *Chem. Ing. Technol.*, 43, 76 (referido em Onken e Liefke, 1989).
- Hayashi, R.** (1996) An overview of the use of high pressure in bioscience and biotechnology. In: *High Pressure Bioscience and Biotechnology: Progress in Biotechnology*. Hayashi, R., Balny, C (eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands.
- Hayashi, R., Balny, C.** (1996) *High Pressure Bioscience and Biotechnology: progress in Biotechnology*. Hayashi, R., Balny, C (eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands.
- Hedén, C.G., Malmberg, A.S.** (1961) *Sc. Repts. Tst. Super. Sanità*, 1, 213 (referido em Onken e Liefke, 1989).
- Hennerberg, W.** (1926) In: *Handbuch der Gärungsbakteriologie*, Vol II, 2nd (ed), Berlin (referido em Phaff, 1985).
- Hensirisak, P.** (1997) Scale up the use of a microbubble dispersion to increase oxygen transfer in aerobic fermentation of baker's yeast. *Tese de mestrado*, Virginia Polytechnic Institute and state University, Virginia.
- Hetherington, P.J., Follows, M., Dunnill, P., Lilly, M.D.** (1971) Release of protein from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial homogenizer. *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 49, 142-148.
- Higgins, I.J.** (1985) What is Biotechnology. In: *Biotechnology: Principles and Applications*. Higgins, I.J., Best, D.J., Jones, J. (eds.) Blackell Scientific Publications, London, 1-23.
- Ho, C.S., Smith, M.D.** (1986) Effect of dissolved carbon dioxide on penicillin fermentation: Mycelial growth and penicilin production. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 668-677.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S.** (1977) Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *App. Environ. Microbiol.*, 33, 5, 1225-1228.
- Huls, P.G., Nanninga, N., Spronsen, E.A., Valkenburg, J.A.C., Vischer, N.O.E., Woldringh, C.L.** (1992) A computer-aided measuring system for the characterization of yeast populations combining 2D-image analysis, electronic particle counter, and flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 343-350.
- Ibrahim, M., Schelegel, H.G.** (1980) Oxygen supply to bacterial suspensions of high cell densities by hydrogen peroxide. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1877-1894.
- Inchaurredo, V.A., Flores, M.V., Voget, C.E.** (1994) Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. *Proc. Biochem.*, 29, 47-54.
- Inchaurredo, V.A., Flores, M.V., Voget, C.E.** (1998) Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 291-298.
- Izawa, S., Inoue, Y., Kimura, A.** (1995) Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*, 368, 73-76.

- Izawa, S., Maeda, K., Miki, T., Mano, J., Inoue, Y., Kimura, A. (1998) Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 330, 811-817.
- Janda, S., Gill, G., Sigler, K., Hofer, M. (1993) Effects of peroxidation on sugar transport in *Schizosaccharomyces pombe*. Absence of membrane lipid peroxidation. *Folia Microbiol.*, 38, 135-140.
- Johnson, F.H., Eyring, J., Polissar, M.J. (1954) *The Kinetic Basis of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Jones, R.P. (1987) Measures of death and deactivation and their meaning: part I. *Proc. Biochem.*, 118-128.
- Jones, R.P., Greenfield, P.F. (1982) Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enz. Microbial. Technol.*, 4, 210-223.
- Ju, L.-K., Armiger, W.B. (1992) Use of perfluorocarbon emulsions in cell culture. *BioTechniq.*, 12, 258-263.
- Kaliterna, J., Weusthuis, R.A., Castrillo, J.I., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1995) Transient response of *Candida utilis* to oxygen limitation: regulation of the Kluyver effect for maltose. *Yeast*, 11, 317-325.
- Kataoka, H., Sato, S., Mukataka, S., Namiki, A., Yoshimura, K., Takahashi, J. (1986) Effects of periodic change in pressure and dissolved-oxygen concentration on the incubation characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 663-667.
- Kato, C., Horikoshi, K. (1996) Deep-sea microbial research and its aspect to high pressure biotechnology. In: *High Pressure Bioscience and Biotechnology: progress in Biotechnology*. Hayashi, R., Balny, C. (eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands.
- Khang, Y.H., Shankar, H., Senatore, F. (1988) Enhanced β -lactam antibiotic production by immobilization of fungus and alga. *Biotechnol. Lett.*, 10, 867-872.
- Kiers, J., Zeeman, A.M., Luttik, M., Thiele, C., Castrillo, J.I., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1998) Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 23359. *Yeast*, 14, 459-469.
- Kim, J.M., Nam, D.H., Yong, C.S., Huh, K. (1995) Oxygen toxicity of superoxide dismutase-deficient *c* by paraquat. *J. Biochem. Bioeng.*, 10(5), 561-567.
- Kluyver, A.J., Custers, M.T.J. (1940) The suitability of disaccharides as respiration and assimilation substrates for yeasts which do not ferment these sugars. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 6, 121-162.
- Krzystek, L., Ledakowicz, S. (2000) Stoichiometric analysis of *Kluyveromyces fragilis* growth on lactose. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 75, 1110-1118.
- Lee, F., Hassan, H. (1985) Biosynthesis of superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. Effects of paraquat and cooper. *J. Free Radicals Biol. Med.*, 1, 319-325.
- Lee, F., Hassan, H. (1987) Biosynthesis of superoxide dismutase and catalase in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 531-540.
- Lee, J.-S., Hah, Y.-C., Roe, J.-H. (1993) The induction of oxidative enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 1015-1018.
- Lee, J.-S., Dawes, I.W., Roe, J.-H. (1995) Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione. *Microbiol.*, 141, 3127-3132.

- Leung, R., Poncelet, D., Neufeld, R.J.** (1997) Enhancement of oxygen transfer rate using microencapsulated silicone oils as oxygen carriers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 68, 37-46.
- L'Italien, Y., Thibault, J., LeDuy, A.** (1989) Improvement of ethanol fermentation under hyperbaric conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 471-476.
- van Loon, A.P.G.M., Pesold-Hurt, B., Schatz, G.** (1986) A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 83, 3820-3824.
- Lukondeh, T., Ashbolt, N.J., Rogers, P.L.** (2003) Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactase-based medium as a source of a natural bioemulsifier. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30(12), 715-720.
- Lundin, A.** (1982) In: *Clinical and Biochemical Luminescence*. Kricke, L.J., Carter, T.J.N. (eds.), Dekker, New York, 43.
- McCord, J.M., Fridovich, I.** (1969) Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6050.
- Macedo, Â.C., Venâncio, A., Malcata, F.X.** (2003) Biotecnologia dos Alimentos. In: *Biotecnologia*. Lima, N., Mota, M. (eds.), Lidel, Portugal, 175-196.
- MacMichael, G.J.** (1988) Effects of oxygen and methyl viologen on *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.*, 170(10), 4995-4998.
- Mager, W.H., Hohmann, S.** (1997) Stress responses mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast Stress Response*. Hohmann, S., Mager, W.H. (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Mager, W.H., Kruijff, A.J.J.** (1995) Stress-Induced Transcriptional Activation. *Microbiol. Rev.*, Sept., 506-531.
- Mager, W.H., Moradas-Ferreira, P.** (1993) Stress response of yeast. *Biochem. J.*, 290, 1-13.
- Maier, B., Dietrich, C., Buchs, J.** (2001) Correct Application of the sulphite oxidation methodology of the measuring the volumetric mass transfer coefficient k_{La} under non-pressurized and pressurized conditions. *Trans. I. Chem. Eng.*, 79, C, 107-112.
- Marquis, R.E.** (1994) High Pressure Microbiology. In: *Basic and Applied High Pressure Biology*. Bennett, P.B., Marquis, R.E. (eds.), University of Rochester Press, New York, USA, 1-14.
- Matsumura, M., Sakuma, H., Yamagata, T., Kobayashi, J.** (1980) Effect of high oxygen concentration on the growth on ethanol of assimilating yeast *Candida* spp. *J. Ferment. Technol.*, 58, 552-559.
- Matsumura, M., Unemoto, K., Shinabe, K., Kobayashi, J.** (1982) Application of pure oxygen in a new gas entraining fermentor. *J. Ferment. Technol.*, 60, 6, 565-578.
- Meneghini, R., Martins, E.L.** (1993) Hydrogen peroxide and DNA damage. In: *DNA and Free Radicals*, Halliwell, B., Aruoma, O.I. (eds.), Ellis Horwood, London.
- Miller, J.F., Shah, N.N., Nelson, C.M., Ludlow, J.M., Clark, D.S.** (1988) Pressure and temperature effects on growth and methane production of the extreme thermophile *Methanococcus jannaschii*. *App. Environ. Microbiol.*, 54, 3039-3042.
- Miller, G. L.** (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 3, 426-428.
- Miquel, J.** (1989) Historical introduction to free and antioxidant biomedical research. In: *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*, vol. I, CRC Press, Inc., USA, Florida.

- Miquel, J., Quintanilha, A., Weber, H. (1989) *Radicals and antioxidants in biomedicine*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Moat, A.G.E., Foster, J.W. (1995) *Microbial Physiology*, 3^{ed} Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, USA.
- Montes, F.J., Catalán, J., Galán, M.A. (1999) Prediction of k_{La} in yeast broths. *Proc. Biochem.*, 34, 549-555.
- Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P., Mager, W. (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molec. Microbiol.*, 19(4), 651-658.
- Nagy, I. (1989) Functional consequences of free radical damage to cell membranes. In: *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*, vol. I, CRC Press, Inc., USA, Florida.
- Nakamura, K., Enomoto, A., Fukushima, H., Nagai, K., Hakoda, M. (1994) Disruption of microbial cells by the flash Discharge of high-pressure carbon dioxide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1297-1301.
- Nelson, C., Schuppenhauer, M., Clark, D. (1991) Effects of hyperbaric pressure on a deep-sea Archaeobacterium in stainless steel and glass-lined vessels. *App. Environ. Microbiol.*, 57, 3576-3580.
- Nelson, C., Schuppenhauer, M., Clark, D. (1992) High-pressure, high temperature biorreactor for comparing effects of hyperbaric and hydrostatic pressure on bacterial growth. *App. Environ. Microbiol.*, 58, 1789-1793.
- Onken, U. (1990) Batch and continuous cultivation of *Pseudomonas fluorescens* at increased pressure. *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 983-989.
- Onken, U., Jostmann, T. (1984) Influence of pressure on growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Lett.*, 6, 413-418.
- Onken, U., Jostmann, T., Weiland, P. (1984) 3rd Europ. Congr. Biotechnol. Abstr. papers III. VCH, Weinheim, 481 (referido em Onken e Liefke, 1989).
- Onken, U., Liefke, E. (1989) Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol.40: Bioprocess and Engineering, Fiechter, A. (eds.), Springer-Verlag, Bertlin, 137-169.
- O'Shea, D.G., Walsh, P.K. (1996) Morphological characterization of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415 by semi-automated image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 51, 679-690.
- Okoshi, H., Sato, S., Mukataka, S., Takahashi, J. (1987) *Agri. Biol. Chem.* 51, 257-262 (referido em Onken e Liefke, 1989)
- Oyevaar, M., Zijl, A., Westerterp, R. (1988) Interfacial areas and gas hold-ups at elevated pressures in a mechanical agitated gas-liquid reactor. *Chem. Eng. Technol.*, 11, 1-10
- Páca, J., Grégr, V. (1979) Effect of p_{O_2} on growth and physiological characteristics of *Candida utilis* in a multistage tower fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1827-1843.
- Perrier-Cornet, J.-M., Maréchal, P.-A., Gervais, P. (1995) A new design intended to relate high pressure treatment to yeast cell mass transfer. *J. Biotechnol.*, 41, 49-58.
- Phaff, H.J. (1985) Biology of yeasts other than *Saccharomyces*. In: *Biology of Industrial Microorganisms*. Demain, A.L., Solomon (eds), N.A. The Benjamin/Cummings Publishing company, Inc., California, 537-562.

- Pinheiro, R., Belo, I., Mota, M.** (1997) Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* under increased air and oxygen pressures. *Biotechnol. Lett.*, 19, 703-708.
- Pinheiro, R., Amaral, L., Ferreira, E.C., Mota, M.** (1998) Automatic determination of yeast cells viability by image analysis. In: *Book of Abstracts, IV Congresso Ibérico de Biotecnologia, I Congresso Ibero-Americano de Biotecnologia*, Mota, M., Ferreira, E.C. (eds.), Guimarães, Portugal, 262.
- Pons, M.N., Vivier, H.** (1998) Morphometry of yeasts. In: *Digital image analysis of microbes: imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications*. Wilkinson, M.H.F., Schut, F. (eds.), John Wiley & Sons, Ltd., England, 199-224.
- Prausnitz, J.M., Lichtenthaler, R.N., Azevedo, E.G.** (1986) *Molecular thermodynamics of fluid-phase equilibria*. 2ª Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Prior, B.A., Kötter, P.** (1997) Pentose utilization by yeasts. In: *Yeast Sugar Metabolism*. Zimmermann, F.K., Entian, K.D. (eds.), Technomic, USA, 435-457.
- Rada, V.** (1997) Effect of *Kluyveromyces marxianus* on the growth and survival of bifidobacteria in milk. *Folia Microbiol.*, 42(2), 145-148.
- Rajoka, M.I., Khan, S., Shahid, R.** (2003) Kinetics and regulation studies of the production of beta-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. *Food Technol. Biotechnol.*, 41(4), 315-320.
- Ranzi, B.M., Porro, D., Compagno, C., Martegani, E.** (1987) Protein and cell volume distributions during the production of beta-galactosidase in batch cultures of *Kluyveromyces lactis*. *J. Biotechnol.*, 5, 227-231.
- Ratledge, C.** (1990) Yeast physiology - A micro-synopsis. In: *Proc. Int. Workshop on Bioreactor Performance - Integrated aspects of physiology and physics: Yeast as a model organism* (ÖGBPT - Austrian Assoc. of Bioprocess Technology, ed.), 37-67.
- Raynal, L., Barnwell, P., Gervais, P.** (1994) The use of epi-fluorescence to determine the viability of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to osmotic shifts. *J. Biotechnol.*, 36, 121-127.
- Revillion, J.P.D., Brandelli, A., Ayub, M.A.Z.** (2003) Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Brazil. Arch. Biol. Technol.*, 46(1), 121-127.
- Rieger, M., Kappeli, O., Fiechter, A.** (1983) The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 653-661.
- Ritossa, F.** (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18, 571-573 (referido em Rodriguez e López, 2003).
- Rodrigues, U., Kroll, R.G.** (1985) The direct epifluorescent filter technique (DEFT): increased selectivity, sensitivity and rapidity. *J. Appl. Bacteriol.*, 59, 493-499.
- Rodriguez, E.E., López, M.D.R.** (2003) Proteínas de estrés y nutrición. *Hig. Sanid. Ambient.*, 3, 36-44.
- van't Riet, K.** (1979) Review of measuring methods and results in non-viscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.*, 18, 357-364.
- Roerdink, J.B.T.M.** (1998) An introduction to digital image processing. In: *Digital image analysis of microbes: imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications*. Wilkinson, M.H.F., Schut, F. (eds.), John Wiley & Sons, Ltd., England, 175-196.
- Sá-Correia, I., Moreira, L.M., Fialho, A.M.** (2003) Engenharia Genética. In: *Biotecnologia*. Lima, N., Mota, M. (eds.), Lidel, Portugal, 175-196.

- Santoro, N., Thiele, D.J.** (1997) Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast Stress Response*. Hohmann, S., Mager, W.H. (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Sato, S., Mukataka, S. Kataoka, H., Takahashi, J.** (1981) Oxygen absorption rate in an aerated stirred tank under increasing pressure. *J. Ferm. Technol.*, 59, 3, 221-225.
- Sato, S., Mukataka, S. Kataoka, H., Takahashi, J.** (1984) *J. Ferment. Technol.*, 62, 71-76 (referido em Onken e Liefke, 1989).
- Schell, D., Farmer, J., Hamilton, J., Lyons, B., McMillan, J.D., Sáez, J.C., Tholudur, A.** (2001) Influence of operating conditions vessel size on oxygen transfer during cellulase production. *App. Biochem. Biotechnol.*, 91-93, 627-642.
- Schlosser, P.M., Riedy, G., Bailey, J.E.** (1994) Ethanol production in Baker's yeast: application of experimental perturbation techniques for model development and resultant changes in flux control analysis. *Biotechnol. Prog.*, 10, 141-154.
- Schnell, N., Krems, B., Entian, K.** (1992) The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr. Genet.*, 21, 269-273.
- Schumpe, A., Quicker, G., Deckwer, W-D.** (1982) Gas solubilities in microbial culture media. In: *Advances in Biocemical Engineering*. Vol. 24, A. Fiechter (ed.), Springer-Verlag, New-York, USA, 1-38.
- Scragg, A.** (1988) *Biotechnology for engineers: Biological systems in technological process*. Ellis Horwood Ltd, England, 19-23.
- Shuler, M.L., Kargi, F.** (1992) Selection, Scale-up, Operation, and Control of Bioreactors. In: *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. Prentice Hall PTR Inc., New-Jersey.
- Sieracki, M.E., Viles, C.L.** (1998) Enumeration and sizing of microorganisms using digital image analysis. In: *Digital image analysis of microbes: imaging, morphometry, fluorometry and motility techniques and applications*. Wilkinson, M.H.F., Schut, F. (eds.), John Wiley & Sons, Ltd., England, 175-196.
- Sies, H.** (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25, 1058-1071.
- Sigler, K., Höfer, M.** (1991) Mechanism of acid extrusion in yeast. *Bioch. Biophys. Acta*, 1071, 375-391.
- Sims, A.P., Barnett, J.A.** (1991) Levels of activity of enzymes involved in anaerobic utilization of sugars by six yeasts species: observations towards understanding the Kluyver effect. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77, 295-298.
- Singh, A.** (1989) Chemical and biochemical aspects of activated oxygen: singlet oxygen, superoxide anion, and related species. In: *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*, vol. I, CRC Press, Inc., USA, Florida.
- Sweere, A.P.J., Mesters, J.R., Janse, L., Luyben, K.C.A.M.** (1988) Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on Baker's yeast production: I. One fermentor system. *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 567-578.
- Smelt, J.P.P.M.** (1998) Recent advances of high pressure processing. *Trends Food Sc. Technol.*, 9, 152-158.
- Smith, I., Viertheller, T., Thorne, C.** (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic Acid). *Anal. Biochem.*, 175, 408-413.

- Sonnleitner, B., Kappeli, O.** (1986) Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 927-937.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A.** (1984) *Principals of Fermentation Technology*. Pergamon Press, Oxford, England.
- Steels, E.L., Learmonth, R.P., Watson, K.** (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol.*, 140, 569-576.
- Stephen, D.W.S., Jamieson, D.J.** (1996) Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 141, 207-212.
- Sturn, F.J., Hurwitz, S.A., Deming, J.W., Kelly, R.M.** (1987) Growth of the extreme thermophile *Sulfolobus acidocaldarius* in a hyperbaric helium biorreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 1066-1074.
- Sumino, Y., Sonoi, K., Akiyama, S-I.** (1992) Oxygen transfer rate in stirred.-tank fermentors under the supply of oxygen-enriched air. *J. Ferm. Bioeng.*, 73, 2, 175-177.
- Surman, S.B., Walker, J.T., Goddard, D.T., Morton, L.H.G., Keevil, C.W., Weaver, W., Skinner, A., Hanson, K., Caldwell, D., Kurtz, J.** (1996) Cpmparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *J. Microbiol. Methods*, 25, 57-70.
- Taniguchi, M., Hoshino, K., Itoh, T., Kumakura, H., Fujii, M.** (1992) Production of superoxide dismutase in *Streptococcus lactis* by a combination of use of hyperbaric oxygen and fermentation with cross-flow filtration. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 886-890.
- Taguchi, H., Humphrey, A.** (1966) Dynamic method of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *J. Ferm. Technol.*, 73, 175-177.
- Taylor, C.D.** (1979) Growth of a bacterium under high-pressure oxy-helium atmosphere. *App. Environ. Microbiol.*, 37, 42-49.
- Thibault, J., Leduy, A., Côté, F.** (1987) Production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under high-pressure conditions, *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 74-80.
- Trevan, M.D.** (1987) Introduction. In: *Biotechnology: The Biological Principals*. Trevan, M.D., Boffey, S., Goulding, K.H., Stanbury, P. (eds.) Open University Press, England, 1-12.
- Thomas, C.R., Paul, G.C.** (1996) Applications of image analysis in cell technology. *Curr. Opinion Biotechnol.*, 7, 35-45.
- van Urk, H., Bruinenberg, P.M., Veenhuis, M., Scheffers, W.A. e van Dijken, J.P.** (1989) Respiratory capacities of mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621 grown under glucose limitation. *Antonie van Leeuwenboek*, 56, 211-220.
- Valderrama, M.J., Silóniz, M.I., Gonzalo, S., Peinado, J.M.** (1999) A differential medium for the isolation of *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis* from dairy products. *J. Food Prot.*, 62(2), 189-193.
- Vecht-Lifshitz, S.E., Ison, A.P.** (1992) Biotechnological applications of images analysis: present and future prospects. *J. Botechnol.*, 23, 1-18.
- Verduyn, C.** (1991) Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie van Leeuwenboek*, 60, 325-353.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, A., van Dijken, J.** (1990a) Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in aerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 395-403.

- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P.** (1990b) Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 405-412.
- Verduyn, C., Stouthamer, A.H., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P.** (1991) A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59, 49-63.
- Walker, G.M.** (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England.
- Walker, G.M., O'Neill, J.D.** (1996) Morphological and metabolic changes in the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy 2415. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 49, 75-89.
- Wang, D., Cooney, C., Demain, A., Dunnill, P., Humphrey, A., Lilly, M.** (1979) *Fermentation and Enzyme Technology*. John Wiley & Sons, New York.
- Westerbeek-Marres, C., Moore, M., Autor, A.** (1988) Regulation of manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of respiratory chain activity. *Eur. J. Biochem.*, 174, 611-620.
- Weusthuis, R.A.** (1994) General Introduction. In: Disaccharide fermentation by yeasts. *Tese de doutoramento*, Universidade de Delft, Netherlands.
- Weusthuis, R.A., Pronk, J.T., van den Broek, P.J.A., van Dijken, J.P.** (1994) Chemostat studies of sugar transport. In: Disaccharide fermentation by yeasts. *Tese de doutoramento*, Universidade de Delft, Netherlands, 25-35.
- Winston, G., Giulio, R.** (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aqua. Toxi.*, 19, 137-161.
- Wise, W.** (1951) The measurement of the aeration of culture medium. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 167-177.
- Yang, J.D., Wang, N.S.** (1992) Oxygen mass transfer enhancement via fermentor headspace pressurization. *Biotechnol. Prog.*, 8, 244-251.
- Yamashita, Y., Kuwasima, M., Nonaka, T., Suzuki, M.** (1993) On-line measurement of cell size distribution and concentration of yeast by image processing. *J. Chem. Eng. Japan*, 26, 6, 615-619.
- Young, H.L.** (1969) Physiological and biochemical changes in bacterial cells exposed to oxygen. *J. Bacteriol.*, 97, 1498-1499.
- Zalewski, K., Buchholz, R.** (1996) Morphological analysis of yeast cells using an automated image processing system. *J. Biotechnol.*, 48, 43-49.
- ZoBell, C.E., Morita, R.Y.** (1957) Deep-sea bacteria. In: *Galathea Reports*, Copenhagen, 43.

Apêndices

Apêndice A– Curvas de calibração

A.1 Calibração da Biomassa

Conforme referido no capítulo 3, sub-capítulo 3.6.1, a análise do doseamento da biomassa em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, foi efectuado através das curvas de calibração obtidas para cada uma das estirpes estudadas. É de referir que, de cada vez que se utilizava um equipamento novo, neste caso, espectrofotómetro, era realizada nova curva de calibração, mantendo constantes as condições de crescimento.

Seguidamente encontram-se descritas as expressões representativas das rectas de calibração para a concentração celular.

Tabela A.1 Expressão das rectas de calibração correspondentes a cada uma das estirpes utilizadas, realizadas no espectrofotómetro 785 da Jasco

Estirpe	Gama de validade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Equação $Abs. = (\alpha \pm S_\alpha) + (\beta \pm S_\beta) \times C_i$	
		$(\alpha \pm S_\alpha)$	$(\beta \pm S_\beta)$
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 10022	0.02 a 0.16	0.039 ± 0.01	3.23 ± 0.16
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 7894	0.05 a 0.31	0.078 ± 0.03	2.82 ± 0.15
<i>Candida utilis</i> CBS 621	0.05 a 0.85	0.130 ± 0.03	2.04 ± 0.15

Em que,

$Abs.$ é a absorvência lida a 620 nm

C_i representa a concentração celular da estirpe i , $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

α é a ordenada na origem da recta

β é o declive da recta

S_α representa o erro padrão da ordenada na origem

S_β representa o erro padrão da ordenada na origem

A.2 Calibração do ATP

Conforme referido no capítulo 3, sub-capítulo 3.6.4.1, a análise do doseamento ao conteúdo em ATP, foi efectuado através das curvas de calibração obtidas para cada um dos kit's utilizados (Lumac ou Sigma).

Tabela A.2 Expressão da recta de calibração correspondentes ao ATP, realizadas no luminómetro Biocounter M2500 (LUMAC)

Kit de análise ao ATP	Gama de validade	Equação	
		$URL = (\alpha \pm S_\alpha) + (\beta \pm S_\beta) \times C_i$	
		$(\alpha \pm S_\alpha)$	$(\beta \pm S_\beta)$
Lumac	2 a 50 (mg·L ⁻¹)	884.3 ± 104.5	3102801 ± 1204.5
Sigma	0.5 a 100 (µg·L ⁻¹)	-816.8 ± 704.5	1130.7 ± 17.5

Em que,

URL é o valor de unidades relativas de luz lido no aparelho

C_i representa a concentração em ATP, µg·L⁻¹

A.3 Calibração dos açúcares

Conforme referido no capítulo 3, sub-capítulo 3.6.2, a análise do doseamento dos açúcares em g·L⁻¹, foi efectuada através das respectivas curvas de calibração. É de referir que, de cada vez que se utilizava um equipamento novo, neste caso, espectrofotómetro, ou se preparava novo reagente DNS, era realizada nova curva de calibração.

Seguidamente encontram-se descritas as expressões das calibrações obtidas para a glucose, lactose e sacarose.

Tabela A.3 Expressão das rectas de calibração correspondentes a cada um dos açúcares doseados, realizadas no espectrofotómetro 785 da Jasco

Açúcar	Gama de validade (g·L ⁻¹)	Equação	
		$Abs. = (\alpha \pm S_\alpha) + (\beta \pm S_\beta) \times C_i$	
		$(\alpha \pm S_\alpha)$	$(\beta \pm S_\beta)$
Glucose	0.05 a 2.0	-0.007 ± 0.011	0.400 ± 0.010
Lactose	0.09 a 1.0	-0.020 ± 0.002	0.469 ± 0.003
Sacarose	0.05 a 1.0	-0.031 ± 0.003	0.592 ± 0.005

Em que,

Abs. é a absorvência lida a 540 nm

C_i representa a concentração de açúcar i , g·L⁻¹

A.4 Calibração dos álcoois

Como já referido no capítulo 3, sub-capítulo 3.6.3, o álcool etanol foi quantificado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). A expressão da calibração obtida encontra-se na tabela seguinte.

Tabela A.4 Expressão da recta de calibração correspondente ao etanol, realizada por HPLC com um detector de índice de refração (830-PU, Jasco) e uma coluna de ácidos orgânicos (Chrompack)

Metabolito	Gama de validade (g·L ⁻¹)	Equação	
		$\acute{Area} = (\alpha \pm S_\alpha) + (\beta \pm S_\beta) \times C_i$	
		$(\alpha \pm S_\alpha)$	$(\beta \pm S_\beta)$
Etanol	0.1 a 10.0	-8158 ± 7102	379779 ± 1413

Em que,

Área representa a área do pico correspondente ao composto i
 C_i representa a concentração do composto i , $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$